



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MATEUS RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOPARTÍCULA NAS PROPRIEDADES
MECÂNICAS, QUÍMICAS E ESTRUTURAIS LONGITUDINAIS DA
INTERFACE ADESIVA EM DENTINA: estudo “*in vitro*”**

2022

MATEUS RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOPARTÍCULA NAS PROPRIEDADES
MECÂNICAS, QUÍMICAS E ESTRUTURAIS LONGITUDINAIS DA INTERFACE
ADESIVA EM DENTINA: estudo “*in vitro*”**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA. Área: Dentística. Linha de Pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em Dentística.

Orientador: Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Co-orientador: Dr. Tiago Moreira Bastos Campos

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Silva, Mateus Rodrigues

Avaliação do efeito de biopartícula nas propriedades mecânicas, químicas e estruturais longitudinais da interface adesiva em dentina: estudo in vitro / Mateus Rodrigues Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Coorientador: Tiago Moreira Bastos Campos

1. Biopartícula. 2. Resistência adesiva. 3. Interface adesiva. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Campos, Tiago Moreira Bastos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting Hofling

Faculdade Sao Leopoldo Mandic

Curso de Odontologia

Campus de Campinas

Prof. Dr César Rogério Pucci

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Sergio Brossi Botta

Universidade Anhanguera

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Profa. Dra. Renata Marques de Melo Marinho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de agosto de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor, Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao meu orientador, Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves, por sua dedicação, profissionalismo e paciência.

Ao meu co-orientador, Dr. Tiago Moreira Bastos Campos, pela determinação à pesquisa e o imenso auxílio em todas as fases da realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Dr. César Rogério Pucci.

Ao Prof. Dr. César Rogério Pucci, por todo o apoio, dedicação e paciência ao longo do curso de doutorado, e especialmente na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Marques de Melo Marinho, por me inspirar, mostrando ser possível e agradável o gradual aprimoramento da minha redação científica.

À Profa. Dra. Tânia Mara da Silva, por sua contribuição na execução desse trabalho.

Aos Professores Doutores Sergio Brossi Botta, Roberta Tarkany Basting Hofling, Renata Marques de Melo Marinho e César Rogério Pucci, por gentilmente terem aceitado participar da minha banca examinadora.

Aos meus professores do Departamento de Odontologia Restauradora - Dentística, Carlos Rocha Gomes Torres e Alessandra Bühler Borges, pela contribuição no meu aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado através do Processo nº 88882434268/2019-01, no período de 01/09/2019 a 26/08/2022.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

À equipe da Sessão Técnica de Pós-graduação, por sua cordialidade sempre que busquei atendimento.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, Fernando e Guilherme, por toda a ajuda e colaboração, sendo sempre solícitos e disponíveis.

À minha família, por possibilitar e apoiar incondicionalmente minha trajetória acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Processo de adesão em dentina.....	11
2.2 Bioatividade de materiais: Silicato de cálcio	15
2.3 Resistência adesiva pelo teste de microtração	16
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Delineamento experimental	21
4.2 Aspectos éticos	22
4.3 Materiais empregados	22
4.4 Obtenção da suspensão de α -wollastonita.....	23
4.5 Preparo das amostras para análise de resistência adesiva	23
4.6 Determinação dos grupos amostrais	25
4.7 Procedimento adesivo.....	27
4.8 Procedimento restaurador	28
4.9 Teste de resistência adesiva à microtração.....	28
4.10 Análise em MEV	30
4.11 Análise de imagens por FTIR.....	31
4.12 Planejamento estatístico	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Teste de resistência adesiva à microtração.....	34
5.1.1 Estatística descritiva	34
5.1.2 Estatística inferencial	35
5.1.3 Análise do tipo de falha.....	38
5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
5.3 Análise química dos substratos em espectroscopia – FTIR	48
5.3.1 Estatística descritiva e inferencial.....	48
6 DISCUSSÃO	52

6.1 Da Metodologia	52
6.2 Dos Resultados.....	57
7 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66

Silva MR. Avaliação do efeito de biopartícula nas propriedades mecânicas, químicas e estruturais longitudinais da interface adesiva em dentina: estudo “in vitro” [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

Este estudo, desenvolvido em duas etapas, avaliou a ação remineralizadora da biopartícula *α-wollastonita* (BP), a partir da reação com H_3PO_4 residual $Si-O-Ca + H_3PO_4 \rightarrow SiO_2 + Ca_5(PO_4)_3(OH)_n + H_2O$, na resistência longitudinal de união e características da interface adesiva, quando aplicada na forma de suspensão (etanol 99,5% + 10% de BP em peso) na superfície dentinária previamente condicionada com H_3PO_4 37%. Na primeira etapa foi realizado um estudo piloto onde, pelas características de precipitação, foi identificada a melhor concentração de biopartículas a serem inseridas na formulação da suspensão. Na segunda etapa, duzentas coroas hígidas de incisivos bovinos foram embutidas em resina acrílica, polidas para padronizar a *smear layer* e divididas aleatoriamente em 2 grupos (n=100), segundo a estratégia adesiva: A - controle (H_3PO_4 + Single Bond™ Universal (SB)); WAS – (H_3PO_4 + BP em suspensão + SB). Blocos de resina composta (Filtek Z250; 3M/ESPE) de 4mm foram confeccionados por técnica incremental sobre as áreas tratadas em todos os grupos, utilizando uma matriz de silicona. As amostras foram então seccionadas para obtenção de palitos retangulares (aproximadamente 1mm²), armazenadas em água deionizada a 4°C em recipientes individuais e divididas em 2 subgrupos (n=50) de acordo com o tempo de armazenamento de 24 h (imediato) e 12 meses (longitudinal), seguidos do teste de resistência adesiva à microtração (10 kgf, 0,5mm/min). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA 2 fatores (p< 0,05) e teste de Weibull 2 parâmetros. As interfaces adesivas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a morfologia da interface resina-dentina, e analisadas por espectroscopia FTIR, para compreensão das interações químicas formadas na superfície dentinária. Os Resultados evidenciaram maiores valores estatisticamente significativos de resistência de união (MPa) para o grupo WAS (37,39 ± 7,48), tratado com BP e armazenado por 24 h, em comparação ao grupo A armazenado por 24 h (27,58 ± 6,43); e, para o grupo WAS armazenado por 12 meses (32,05 ± 10,64) em comparação ao grupo A armazenado por 12 meses (22,84 ± 5,76). Dados do FTIR evidenciaram o efeito da *α-wollastonita* na preservação do colágeno. A biopartícula mostrou ser promissora na manutenção longitudinal da qualidade da interface adesiva.

Palavras-chave: Biopartícula. Resistência adesiva. Interface adesiva.

Silva MR Evaluation of the bioparticle effect on the mechanical, chemical and longitudinal structural properties of the dentin adhesive interface: an “in vitro” study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

This study, developed in two stages, evaluated the remineralizing action of the α -wollastonite (BP) bioparticle, from the reaction with residual $\text{Si-O-Ca} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{SiO}_2 + \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_n + \text{H}_2\text{O}$, on the longitudinal bond strength and characteristics of the adhesive interface, when applied as a suspension (99.5% ethanol + 10% BP by weight) on the dentin surface previously etched with 37% H_3PO_4 . In the first stage, a pilot study was carried out where, due to the precipitation characteristics, the best concentration of bioparticles to be inserted in the suspension formulation was identified. In the second step, two hundred sound bovine incisor crowns were embedded in acrylic resin, polished to standardize the smear layer and randomly divided into 2 groups ($n=100$), according to the adhesive strategy: A - control (H_3PO_4 + Single Bond™ Universal (SB)); WAS – (H_3PO_4 + BP in suspension + SB). Composite resin blocks (Filtek Z250; 3M/ESPE) of 4 mm were made by incremental technique on the treated areas in all groups, using a silicone matrix. The samples were then sectioned to obtain rectangular sticks (approximately 1mm^2), stored in deionized water at 4°C in individual containers and divided into 2 subgroups ($n=50$) according to the storage time of 24 h (immediate) and 12 months (longitudinal), followed by the microtensile bond strength test (10 kgf, 0.5 mm/min). Data were submitted to 2-way ANOVA ($p<0.05$) and 2-parameter Weibull test. The adhesive interfaces were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the morphology of the resin-dentin interface, and analyzed by FTIR spectroscopy, to understand the chemical interactions formed on the dentin surface. The results showed higher statistically significant values of bond strength (MPa) for the WAS group (37.39 ± 7.48), treated with BP and stored for 24 h, compared to group A stored for 24 h ($27, 58 \pm 6.43$); and for the WAS group stored for 12 months (32.05 ± 10.64) compared to group A stored for 12 months (22.84 ± 5.76). FTIR data evidenced the effect of α -wollastonite on collagen preservation. The bioparticle showed promise in the longitudinal maintenance of the quality of the adhesive interface.

Keywords: Bioparticle. Adhesive resistance. Adhesive interface.

1 INTRODUÇÃO

Mesmo após seis décadas da implementação da tecnologia adesiva na Odontologia, a longevidade restauradora, sobretudo em dentina, continua sendo desafiadora, tanto pelas características do substrato, quanto pela composição dos sistemas adesivos, implicando numa elevada taxa de falhas e substituições de restaurações (3 a 3,5 vezes quando comparadas ao amálgama) (Spencer et al., 2012; Song et al., 2019). A razão primária para estas falhas é a cárie secundária (numa taxa de 80-90%) que ocorre nas margens gengivais de restaurações de classes II e V em resina composta (Song et al., 2019).

Por ser muito viscoso e hidrofóbico, o material resinoso não se liga diretamente à estrutura dental, necessitando de um adesivo de baixa viscosidade e maior hidrofiliabilidade. Na margem gengival, o adesivo e a camada de adesão formada entre o dente e o compósito representam a primeira defesa contra enzimas, ácidos, bactérias e outras substâncias que podem minar a restauração resinosa em curto período de tempo. Inúmeros estudos demonstram que o estabelecimento de uma interface adesiva de qualidade entre dentina e adesivo é mais complexa pelas características inerentes a este substrato, representando o elo frágil dessas restaurações (Pashley et al., 2007; Spencer et al., 2010; Frassetto et al., 2016; Song et al., 2019).

Adesivos odontológicos são uma mistura de sistemas monoméricos hidrofílicos e hidrofóbicos (comumente à base de metacrilatos) utilizados para aderir compósitos restauradores ao esmalte e à dentina (Van Landuyt et al., 2007). Os monômeros são críticos para a formação de uma matriz de ligações cruzadas, projetadas para prover estabilidade química e física para a interface compósito/adesivo/dentina (Song et al., 2019). Por isso, o Bis-GMA é o mais popular agente de ligações cruzadas utilizado na composição dos sistemas adesivos, oferecendo qualidade estética e excelentes propriedades mecânicas, por sua alta viscosidade. Para superar esta desvantagem, um monômero de baixa viscosidade e características hidrofílicas (HEMA- 2 hidroxiethylmetacrilato) é frequentemente incorporado, além de agentes de ligação cruzada de baixa viscosidade, como TEGDMA, UDMA e GDMA, e fotoiniciadores.

A aplicação desse sistema é sumarizada em dois processos fundamentais que estabelecem a adesão micromecânica à dentina: (a) remoção da fase mineral da superfície dentinária através de condicionamento ácido, expondo-se a rede de fibrilas de colágeno e; (b) preenchimento dos espaços interfibrilares com uma resina fluida que sofre polimerização *in situ*, formando a estrutura imbricada conhecida como camada híbrida ou zona de interdifusão (Nakabayashi et al., 1982; Van Meerbeek et al., 1992; Pashley et al., 2011). No entanto, a complexa composição da dentina e a presença de fluidos/intrínsecos e/ou extrínsecos durante os procedimentos adesivos acarretam uma série de processos inter-relacionados que limitam a estabilidade longitudinal da camada híbrida: infiltração incompleta de monômeros, polimerização parcial, separação de fases do adesivo, degradação hidrolítica do polímero e degradação enzimática do colágeno desprotegido subjacente (Santerre et al., 2001; Santini, Miletic, 2008; Spencer, Wang, 2002; Tjäderhane et al., 2013).

Na busca pela estabilidade longitudinal, a incorporação de partículas bioativas aos sistemas adesivos mostra-se como um campo promissor na obtenção desta qualidade tão necessária ao processo (Ho et al., 2007; Profeta et al., 2013; Tay, Pashley, 2008).

A utilização de biomateriais, e o desenvolvimento de novas técnicas para síntese desses novos materiais vem crescendo exponencialmente (Ratner, Bryant 2004; Sauro et al., 2012; Sauro et al., 2013; Ribas et al., 2019; Zhang et al., 2015). Dentre os materiais com elevado potencial bioativo, destacam-se os silicatos de cálcio (como a *α-wollastonita*), silicato dicálcico e tricálcico (Aly et al., 2016; Choudhary et al., 2016), por constituírem-se em importantes elementos para o processo de formação de tecidos mineralizados (Cerruti, Sahai, 2006; Núñez-Rodríguez et al., 2018), sendo então utilizados no seu reparo ou substituição. Além disso, possuem resistência à compressão satisfatória e boa resistência ao desgaste comparados a outros materiais. A *α-wollastonita* (α -CaSiO₃), uma modificação da *wollastonita* (Ebisawa et al., 1990; Núñez-Rodríguez et al., 2018), é um material com elevada bioatividade que propicia a liberação de íons Ca²⁺ com a formação de grupamentos silanol (Si-OH) quando em contato com fluidos corporais, viabilizando a mineralização do colágeno por meio da nucleação da apatita na superfície do material (formação *in vivo* de compostos inorgânicos por organismos vivos) (Chang, Chen, 2008; Choudhary et al., 2016; Ebisawa et al., 1990; Kokubo, 1998; Ribas et al., 2019).

A associação de partículas bioativas com um sistema adesivo pode aumentar

a longevidade da interface adesiva (Profeta et al., 2012, 2013; Sauro et al., 2012; Zhang et al., 2015), por sua capacidade de interagir com os tecidos duros dentais, através da deposição de biopartículas de fosfato de cálcio sobre a estrutura dental, aumentando a força de união na interface dente-restauração. A adição de biopartículas na formulação de adesivos experimentais, de acordo com estudos realizados por Sauro e colaboradores (2012, 2013), parece favorecer a remineralização do colágeno desprotegido após o ataque ácido, além de contribuir para o aumento do pH, levando a uma inibição do crescimento bacteriano e, consequentemente, diminuindo a ação das MMPs.

No entanto, ainda não há uma compreensão total desta interação e nem do melhor protocolo para utilização clínica (Bedran-Russo et al., 2014). Outra dúvida que persiste quanto à associação entre partículas bioativas e sistemas adesivos é se realmente tais partículas não serão inativadas e/ou aprisionadas na matriz polimerizada, deixando de exercer as ações esperadas.

Assim, apesar das partículas bioativas se apresentarem como promissoras opções para restaurações mais duradouras, o melhor protocolo para sua incorporação ou aplicação prévia ao adesivo ainda necessita ser investigado, tomando-se em conta que a concentração ideal de biopartícula diretamente incorporada no sistema adesivo poderia inviabilizar o seu uso por razões estéticas ou mesmo de viscosidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresentada a seguir, sem a pretensão de esgotar o assunto, teve por finalidade apresentar os artigos científicos de maior relevância utilizados como referência para a escrita desse trabalho. Essa, por sua vez, foi dividida em tópicos com a finalidade de torná-la mais didática em: processo de adesão em dentina, onde foram destacadas as características estruturais do tecido dentinário com ênfase à formação de uma eficaz interface de união; bioatividade de materiais, com ênfase ao silicato de cálcio; resistência adesiva pelo teste de microtração, com os principais trabalhos que mostram detalhes relevantes para a execução dos testes e sua interpretação.

2.1 Processo de adesão em dentina

A compreensão dos mecanismos de adesão em dentina demanda extenso conhecimento sobre a composição e a complexidade estrutural desse substrato.

Ainda em 1955, Buonocore, revolucionou a odontologia restauradora através de um estudo buscando obter adesão entre a resina acrílica e o esmalte, no qual realizou alteração da superfície dentária por meio de tratamentos químicos com ácidos fosfomobdato oxálico a 50% e fosfórico a 85%, de modo a produzir uma superfície mais receptiva aos materiais adesivos. O tratamento com ácido fosfórico promoveu aumento na área de superfície, permitindo um contato mais íntimo entre a resina e o esmalte, aumentando a adesão.

Fusayama et al. (1979) estendeu esse condicionamento à dentina, obtendo excelentes resultados sobre este tecido, até então imaculado, no que se referia a um tratamento de superfície com ácido. Desde então, o condicionamento ácido é utilizado nos tecidos duros dentais como pré-tratamento aos procedimentos adesivos.

Em 1982, o conceito de uma camada híbrida foi apresentado pela primeira vez por Nakabayashi e colaboradores após conduzirem experimento empregando soluções de cloreto férrico a 3% e 10% de ácido cítrico (solução 10-3) em esmalte e dentina previamente à utilização do monômero 4-META. Segundo os autores

monômeros resinosos com grupamentos hidrofóbicos e hidrofílicos, como o 4-META, infiltravam-se por entre as fibras colágenas expostas pelo tratamento ácido e, após sua polimerização, constituíam uma zona mista, ácido resistente, de dentina desmineralizada permeada por resina, denominada camada híbrida, a qual promovia aumento na resistência de união da resina composta à dentina. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que os monômeros possuíam afinidade pelos tecidos duros dentais através da formação desta camada com características híbridas, com resistência de união em torno de 18 MPa. Este estudo teve grande contribuição nas mudanças no campo da odontologia adesiva. Entretanto, a adesão à dentina continua sendo tema de numerosos estudos, devido à composição e variabilidade morfológica que o esse tecido apresenta, especialmente se consideradas as condições clínicas, em que podem ser verificadas a presença de dentina infectada, afetada, desmineralizada e cariada num mesmo substrato.

A dentina é um tecido mineralizado dental, formado por uma estrutura de cristais de hidroxiapatita permeada por uma rede de fibrilas de colágeno. Dessa forma, apresenta-se como um tecido mineralizado e tubular composto, em volume, por aproximadamente 50% de material inorgânico (cristais de hidroxiapatita), 30% de material orgânico (fibras colágenas) e 20% de água (Linde, Goldberg, 1993; Goldberg et al., 2011). A dentina é permeada por uma densa rede de túbulos que promovem a comunicação da superfície mais externa (limites amelodentinário e amelocementário) com a cavidade pulpar. Nesse trajeto, a densidade e diâmetro tubulares variam em função da profundidade do substrato, sendo maiores na dentina profunda (Garberoglio, Brännström, 1976; Tjäderhane et al., 2012). Por sua grande complexidade, a dentina constitui-se em um substrato desafiador à adesão, que varia, inclusive, de acordo com a face dental. Estudos mostram que a dentina oclusal representa um maior desafio em comparação as faces vestibular e proximais, devido a variabilidade no número, tamanho e orientação dos túbulos (Garberoglio, Brännström, 1976; Pashley, 1989; Oilo, Olsson, 1990; Prati, Pashley, 1992; Perdigão, 2010). Com estrutura fisiológica e anatomicamente complexa, a dentina pode ser caracterizada em diferentes tipos, como: peritubular, intertubular e esclerosada, que apresentam diferentes graus de mineralização e permeabilidade, além de se distribuírem em proporções variáveis pela estrutura dentária (Goldberg et al., 2011; Tjäderhane et al., 2012). Essas propriedades podem afetar direta ou indiretamente a

resistência de união dos materiais adesivos no substrato (Pashley, 1992; Escribano et al., 2001; Ozok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007).

Já na década de 1960, Brännström e colaboradores propuseram a teoria hidrodinâmica, segundo a qual um estímulo aplicado à dentina provoca o deslocamento de fluido dentro dos túbulos (Brännström et al., 1967). Esse deslocamento por capilaridade, é impulsionado pela pressão hidrostática intrapulpar, da polpa para o meio externo, sendo responsável pela umidade na superfície dentinária. A umidade característica do substrato pode interferir fisicamente e quimicamente no processo de adesão e na qualidade da interface adesiva (Pashley, Carvalho, 1997). Durante o procedimento restaurador, o excesso de umidade dentinária pode provocar a separação de fases do adesivo, incorporação de bolhas de água, falhas e porosidades na interface adesiva (Spencer, Wang, 2002; Sauro et al., 2007). Na fase pós-restauração, a sorção de fluidos da cavidade bucal promove plasticização dos polímeros e solubilização dos monômeros resinosos (Ferracane, 2006). Além disso, os materiais restauradores são constantemente submetidos a estresses oclusais ou mecânicos derivados das cargas mastigatórias, a desafios térmicos, às enzimas e agentes químicos, que afetam a interface adesiva, comprometendo a integridade da restauração (Nakajima et al., 2011).

O maior desafio à longevidade da interface adesiva em dentina é a presença de água, a hidrólise é considerada razão primária para a degradação adesiva na camada híbrida, contribuindo para a redução da resistência de união ao longo do tempo (Carrilho et al., 2005; Nakajima et al., 2011; Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015; Frassetto et al., 2016). São conhecidos dois mecanismos de degradação hidrolítica nos componentes da camada híbrida: degradação do sistema adesivo e degradação das fibrilas colágenas (Tjäderhane, 2015; Carvalho, Manso, 2016).

O molhamento do substrato dentinário durante o procedimento adesivo, favorecido pelo condicionamento ácido da dentina, por aumentar sua permeabilidade, pode afetar a estrutura do sistema adesivo, promovendo a separação de suas fases (hidrofílicas e hidrofóbicas), diluindo e/ou impedindo a polimerização dos monômeros resinosos, levando à infiltração irregular do adesivo na interface (Spencer, Wang, 2002; Sartori et al., 2015; Tjäderhane, 2015). O sistema adesivo pode ainda preencher apenas parcialmente a região de dentina desmineralizada, resultando na formação de zonas de fragilidade na camada híbrida, nas quais há colágeno exposto, ou seja, não protegido pelo sistema adesivo (Van Meerbeek et al., 2010; Reis et al., 2013; Frassetto

et al., 2016). O colágeno exposto pode sofrer degradação pela ação das enzimas chamadas metaloproteinases (MMPs) (Pashley et al., 2004). A degradação do colágeno resulta da ação de enzimas endógenas, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) e enzimas catepsinas de cisteína, presentes na matriz dentinária, e da degradação proteolítica das fibrilas colágenas, o que reduz a integridade estrutural da interface adesiva a longo prazo (Pashley et al., 2004; Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2010; Mobarak, 2011; Sartori et al., 2015). As MMPs são enzimas cálcio e zinco-dependentes, produzidas pelos odontoblastos durante a secreção da matriz dentinária (Palosaari et al., 2003; Reis et al., 2013; Mazzoni et al., 2015; Tjäderhane, 2015). Embora o papel fisiológico das MMPs na dentina ainda não tenha sido totalmente esclarecido pela literatura, estudos sugerem que estas enzimas auxiliam na formação da dentina peritubular e, durante o processo de cárie, da dentina terciária; o que regularia as reações defensivas do complexo dentino-pulpar (Tjäderhane et al., 2013, 2015). Concomitantemente, as MMPs também necessitam de água para hidrolisar ligações peptídicas no colágeno exposto (Pashley et al., 2004) e requerem ambiente ácido para serem ativadas (Reis et al., 2013; Tjäderhane et al., 2013, 2015; Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015). Assim, as MMPs podem ser ativadas tanto pela metabolização bacteriana durante o processo da cárie, quanto pelas propriedades acídicas dos sistemas adesivos (Hebling et al., 2005; Pinna et al., 2015).

Em meio bucal, a própria saliva, além de alimentos, bebidas e sua interação, podem também contribuir com a degradação e o envelhecimento da interface adesiva, dificultando a identificação dos fatores específicos relacionados à degradação ao longo do tempo (Sideridou et al., 2007; Marghalani, Watts, 2013). Diante disso, modelos de envelhecimento artificial “*in vitro*” foram propostos pela literatura a fim de esclarecer o comportamento e a duração das restaurações adesivas. Nos estudos longitudinais de resistência de união, os modelos de envelhecimento *in vitro* mais frequentemente empregados envolvem a imersão em líquidos simuladores de alimentos (Lee et al., 1995; Vicente et al., 2012; Vouvoudi, Sideridou, 2012; Deng et al., 2014; Sideridou et al., 2015). Estes líquidos são comumente solventes ou soluções presentes na cavidade bucal (água deionizada, saliva), ou agentes externos (bebidas gaseificadas, bebidas alcoólicas), com diferentes ingredientes, pH, viscosidade (Vouvoudi, Sideridou, 2012). A água, um solvente polar, é a substância mais amplamente empregada na literatura para simular o ambiente oral proporcionado pela saliva, bem conhecida por suas interações com componentes hidrofílicos de sistemas

adesivos e materiais restauradores na adesão (Wang, Spencer, 2003; Spencer et al., 2010; Marghalani, Watts, 2013; Sartori et al., 2015). A relevância da água é demonstrada em estudos que evidenciam a redução dos valores de resistência adesiva longitudinal quando amostras são armazenadas imersas em meio aquoso (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2005; Erhardt et al., 2008a; Carvalho et al., 2013; Pinna et al., 2015), acelerando a degradação dos materiais resinosos e prejudicando suas propriedades físico-mecânicas, como resistência à tração, à flexão e ao desgaste (Pashley, Carvalho, 1997; Zhang, Xu, 2008). A resistência de união na interface adesiva diminuirá se as propriedades mecânicas dos sistemas adesivos forem reduzidas devido aos fluidos orais e sorção de água, (Pashley, Carvalho, 1997; Yasuda et al., 2008).

2.2 Bioatividade de materiais: Silicato de cálcio

O estudo da bioatividade de silicatos de cálcio sem a presença de P_2O_5 demonstrou que esses compostos químicos são aptos à formação de uma camada superficial similar à fase cristalográfica e química do osso através da dissolução de íons de cálcio na superfície do vidro (Kokubo et al., 1990). Quando em contato com fluidos corpóreos, há uma reação química entre o cálcio e o silício presentes no material (silicatos de cálcio) e o fosfato presente no ambiente fisiológico, o que promove a formação de uma camada superficial de hidroxiapatita de cálcio ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) possibilitando a mineralização do tecido biológico (Hulbert et al., 1982; Heimke, 1989).

Como mencionado anteriormente, a associação de biopartículas à formulação de adesivos experimentais, além de, aparentemente, contribuir para o aumento do pH levando a uma inibição do crescimento bacteriano e diminuindo a ação das MMPs, favorece a remineralização do colágeno desprotegido após o ataque ácido, aumentando a força de união na interface dente-restauração (Sauro et al., 2012; Sauro et al., 2013). A pseudowollastonita (α - $CaSiO_3$), um material com elevada bioatividade (Ebisawa et al., 1990), quando em contato com fluidos corporais, como o fluido dentinário, libera íons Ca^{2+} e forma $Si - OH$ na superfície, estimulando a formação de tecidos mineralizados e a mineralização do colágeno por meio da

nucleação da apatita na superfície do material (formação in vivo de compostos inorgânicos por organismos vivos) (Ebisawa et al., 1990; Kokubo, 1998; Chang, Chen, 2008; Ribas et al., 2019).

A pseudowollastonita é uma fase extremamente rara e ocorre à elevadas temperaturas (acima de 1125°C) com sistema cristalino monoclinico e estrutura de anéis trissilicatos isolados (Nuñez-Rodriguez et al., 2018; Seryotkin et al., 2012; Salman et al., 2015). Sua obtenção pode ser feita por meio do processo sol-gel, uma técnica simples que consiste na conversão de um sistema com partículas de tamanho coloidal (sol) e posterior formação de uma rede tridimensional (gel) por meio de uma reação química (Reuter, 1991). Esse método pode ser utilizado na preparação de pós e recobrimentos bioativos devido a possibilidade de controle dos tamanhos e formas das partículas e obtenção do pó com elevada pureza e homogeneidade (Reuter, 1991; Seryotkin et al., 2012; Salman et al., 2015).

2.3 Resistência adesiva pelo teste de microtração

Problemas decorrentes de ensaios de tração e cisalhamento para avaliação da resistência adesiva passaram a ser relatados na literatura ainda no final da década de 1980. Van Noort e colaboradores, concluíram em 1989, ser necessária uma padronização para medir a resistência adesiva e fornecer uma comparação universal válida entre diferentes agentes de união.

A eficácia da união adesiva e o sucesso clínico do procedimento restaurador, são avaliados não apenas pelo comportamento imediato, mas também por sua durabilidade a longo prazo diante das condições orais (Toledano et al., 2007; Skovron et al., 2010).

A qualidade da restauração adesiva é frequentemente avaliada por meio de testes de resistência adesiva ao cisalhamento ou à microtração, nos quais é aplicada uma carga até que ocorra a falha (Carrilho et al., 2005; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008; Erhardt et al., 2008c, 2014; Taniguchi et al., 2009; Armstrong et al., 2010; Xuan et al., 2010; Deng et al., 2014; Feitosa et al., 2014; Marchesi et al., 2014; Reis et al., 2015; Sartori et al., 2015; Shibata et al., 2016). Quanto maior a adesão

entre dente e material restaurador, maior será a resistência de união durante a função mastigatória.

O ensaio de resistência adesiva à microtração proposto, em 1994, por Sano et al. possibilitou a obtenção de múltiplos espécimes a partir de um único dente, devido à redução das dimensões dos espécimes utilizados nos testes de tração afim de avaliar a resistência adesiva em áreas de aproximadamente 1 mm², proporcionando melhor distribuição da tensão na interface e, adicionalmente, permitindo a obtenção de múltiplas medidas em apenas um dente. Diante da escassez de dentes gerada pelo rigor dos princípios éticos em pesquisa, a obtenção de múltiplos espécimes a partir de um único dente torna vantajoso o teste de microtração, fazendo com que seja o mais utilizado em estudos de adesão, além de ser confiável por estar correlacionado com a prática clínica (Loguercio et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2010; De Munck et al., 2013; Fu et al., 2013; Armstrong et al., 2017).

Apesar de evidentes vantagens do teste de microtração, como a obtenção de uma grande quantidade de palitos ou espécimes a partir de um único dente, ou poucos dentes para cada grupo experimental, a redução do coeficiente de variação do método, diminuição do número de falhas coesivas, a possibilidade de estudar diferentes regiões em um mesmo elemento dental e a maior facilidade para avaliar o tipo de fratura por análise em MEV (Camargo et al., 2007), abordagens controversas do teste de microtração suscitaram questionamentos por parte de pesquisadores quanto ao objeto (todo o dente, ou cada palito) a ser considerado como unidade experimental. Entretanto, quando se considera o palito a unidade experimental, e não o dente (valor da média dos palitos por cada dente), ocorre uma falha estatística, pois os dados são tratados de forma independente quando na verdade são dependentes, pois os palitos provenientes do mesmo dente foram submetidos ao mesmo tratamento (Loguercio et al., 2005; Camargo et al., 2007). Portanto, leva-se em consideração a média calculada dos espécimes testados para cada dente, sendo a unidade experimental o dente e não o palito (Loguercio et al., 2005; Camargo et al., 2007; Roulet, Van Meerbeek, 2007).

Objetivando prever a longevidade clínica de sistemas adesivos, métodos validados pela literatura investigam *in vitro* a durabilidade da adesão a longo prazo pelo armazenamento das amostras em solventes, como água e/ou etanol (Esteves et al., 2022; Van Meerbeek et al., 2010; Silva et al., 2022; Takamizawa et al., 2015), fazendo uso, essencialmente, de duas técnicas de armazenagem que são a

armazenagem direta, a qual consiste na realização de procedimentos adesivo e restaurador, seguidos da secção da amostra em palitos que serão então armazenados em solvente à 37°C por período de tempo pré-determinado e, posteriormente, submetidos a ensaio de microtração (Hashimoto et al., 2002; Loguercio et al., 2005; Toledano et al., 2007); e na armazenagem indireta, os espécimes são armazenados em solvente à 37°C imediatamente após os procedimentos adesivo e restaurador, e somente depois de determinado período de tempo serão seccionados em palitos e submetidos a ensaio de microtração (Loguercio et al., 2005; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008). Como no armazenamento direto a área transversal da amostra é reduzida, a degradação ocorre de forma mais acelerada, pois a distância e o tempo de difusão do solvente através das partes expostas da interface da restauração são menores, em comparação às superfícies maiores (Hashimoto et al., 2002), diminuindo significativamente a resistência adesiva e aumentando a nanoinfiltração, quando comparado ao armazenamento indireto (Hashimoto et al., 2002, 2003; Abdalla, Feilzer, 2008; Marchesi et al., 2014).

Embora não haja um consenso sobre o período mínimo ou ideal, os espécimes restaurados precisam ser armazenados para estudo da degradação da interface. Diferentes autores relatam que os espécimes podem ser armazenados em solventes por períodos que variam de 7 dias a 10 dias, algumas semanas, 1 a 12 meses e até 4-5 anos (Yamauti et al., 2003; De Munck et al., 2003; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008; Moraes et al., 2008; Erhardt et al., 2008a, 2008b; Skovron et al., 2010; Mobarak, 2011; De Munck et al., 2013; Marghalani, Watts, 2013; Leme et al., 2015; Sideridou et al., 2015). Estudos evidenciaram que a degradação de sistemas adesivos à base de HEMA e BisGMA foi mais acelerada nos primeiros 7 a 8 dias de armazenamento (Lee et al., 1995; Akova et al., 2006; Kostoryz et al., 2009), e também que em cerca de 3 meses, todas as classes de sistemas adesivos exibiam evidências mecânicas e morfológicas de degradação, semelhantes ao envelhecimento in vivo (Kato, Nakabayashi, 1998; Shono et al., 1999; Skovron et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2010).

A hidrólise dos componentes da interface adesiva se relaciona diretamente com sua degradação. Assim, além do período de imersão, a frequência da troca do solvente também é foco de interesse em estudos sobre a longevidade da adesão. A literatura aponta que quando não há substituição do meio de armazenagem, se estabelece um equilíbrio na transferência de íons de cálcio entre dentina e solução de

armazenagem, desacelerando o processo de degradação longitudinal (Kitasako et al., 2000). Enquanto trocas diárias parecem favorecer a degradação da interface adesiva em um curto período de tempo, nenhuma diferença significativa foi observada entre trocas semanais e mensais (Skovron et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo é fornecer elementos para contribuir com a compreensão das interações entre biopartículas, sistemas adesivos e substrato dentinário, na busca pela maior estabilidade longitudinal da adesão.

O objetivo específico é: avaliar a ação remineralizadora da biopartícula pseudowollastonita (*α -wollastonita*), quando aplicada na forma de suspensão (etanol 99,5% + 10% de biopartícula em peso) na superfície dentinária previamente condicionada com H_3PO_4 a 37% em peso, na resistência longitudinal de união pelo teste de microtração. E, nas características da interface adesiva, por meio espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H01) A aplicação de biopartícula pseudowollastonita (*α -wollastonita*), na forma de suspensão (etanol 99,5% + 10% de biopartícula em peso) na superfície dentinária previamente condicionada com H_3PO_4 a 37%, não influencia a resistência imediata e longitudinal de união;

H02) O tempo de armazenamento, não influencia a resistência de união.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Fatores em estudo:

- Protocolo adesivo em dentina bovina (2 níveis)
 - Grupo controle - A:
 - Condicionamento ácido seguido pela aplicação do sistema adesivo Single Bond™ Universal.
 - Grupo experimental - WAS:
 - Condicionamento ácido seguido pela aplicação de (α -wollastonita em suspensão) e aplicação do sistema adesivo Single Bond™ Universal.
- Tempo (2 níveis):
 - 24 horas de armazenamento;
 - 12 meses de armazenamento.

Variáveis resposta:

- Variação da resistência adesiva imediata e longitudinal (microtração);
- Interações químicas formadas na superfície da dentina (FTIR);
- Avaliação da morfologia da interface resina-dentina (microscopia eletrônica de varredura - MEV);

4.2 Aspectos éticos

O estudo, submetido à Comissão de ética no uso de animais – CEUA do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista / UNESP, Campus de São José dos Campos, não necessitou ser analisado, devido a pesquisa em tela não envolver a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos, como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei “Arouca”.

4.3 Materiais empregados

Os materiais para este estudo encontram-se especificados no Quadro 1, bem como o modo de aplicação seguindo as recomendações do fabricante.

Quadro 1 – Composição e aplicação dos materiais

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	APLICAÇÃO
Single Bond™ Universal	3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil.	15-25% BisGMA, 15-25% HEMA, 5-15% resinas dimetacrilato, 5-15% silano, 1-10% monômero fosfato MDP, 1-5% copolímero do Vitrebond™ (ácido polialcenóico), 10-15% etanol, 10-15% água.	Com <i>microbrush</i> , aplicar o adesivo ativamente por 20 s sobre a dentina condicionada. Secar com jato de ar suave e Fotopolimerizar por 10 s.
Filtek Z250 XT.	3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil.	BisGMA, BisEMA UDMA, TEGDMA, PEGDMA, nanopartículas de zircônia/sílica.	Inserir incrementos de 2 mm. Fotopolimerizar cada incremento por 20 s.
<i>α-wollastonita</i>	Dr. Tiago Moreira Bastos Campos. CTA-ITA, São José dos Campos, SP, Brasil	CaSiO ₃ – Ca ₃ [Si ₃ O ₉]	Suspensão 10% em peso, em etanol absoluto. Com <i>microbrush</i> , aplicar a suspensão ativamente por 20 s sobre a dentina condicionada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

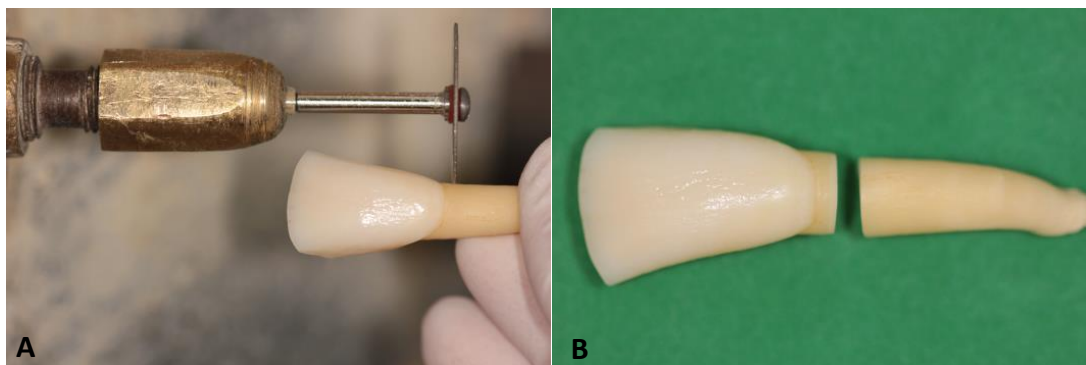
4.4 Obtenção da suspensão de α -wollastonita

Foram preparadas suspensões com diferentes percentagens em peso da biopartícula α -wollastonita (com dimensões entre 20 μm e 30 μm) em álcool etílico absoluto 99,5% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Após a pesagem minuciosa dos componentes em balança de precisão (Mettler, Toledo, OH, EUA), os mesmos foram misturados em vidro fechado âmbar em vibrador (Maxi Mix II VortexMixer, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Alemanha) até a obtenção de uma suspensão homogênea. Em seguida, foram mantidos sob agitação constante (Orbit 300, LabNET International Inc., Woodbridge, NJ, EUA), por 48 horas. A análise da melhor concentração (10% em peso da biopartícula) foi visual, pelas características de precipitação.

4.5 Preparo das amostras para análise de resistência adesiva

Foram utilizados 200 incisivos bovinos limpos e armazenados em solução fisiológica de timol 0,1% em freezer a -18°C . Os 200 incisivos bovinos foram seccionados a 2 mm da junção amelo-cementária (Figura 1A), com auxílio de um disco diamantado (Dremel, Campinas, SP, Brasil) adaptado em torno de alta rotação (Nevoni, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para separação da coroa da porção radicular, a qual foi desprezada (Figura 1B).

Figura 1- Fluxograma do delineamento experimental



Legenda: A) secção da coroa além da junção amelocementária com disco diamantado. B) separação da coroa e da porção radicular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

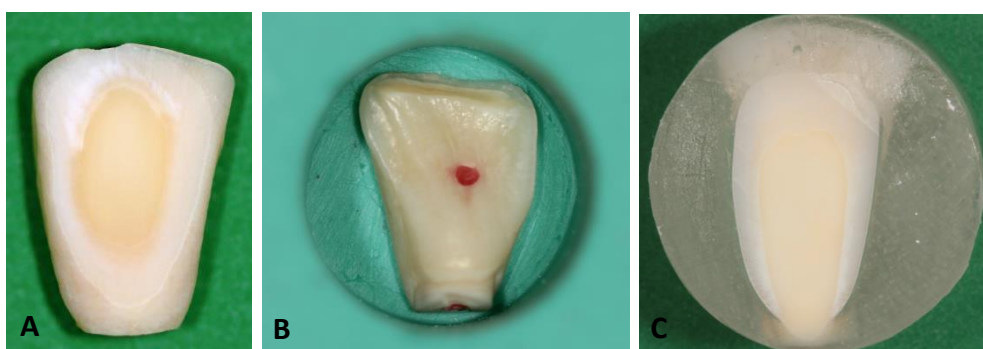
Uma abertura coronária foi realizada na face lingual de cada incisivo com uma ponta diamantada esférica 1016 HL (KG Sorensen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na região do cingulo, para possibilitar a mensuração e padronização em 2 mm da espessura do remanescente dentinário na porção vestibular da coroa, medido através de um espessímetro (Otto-Arminger & Cia Ltda., RS, Brasil). Na face vestibular, foi realizado um desgaste do esmalte remanescente criando uma superfície plana de dentina com uma área de aproximadamente 8 mm² (Figura 2A). O desgaste foi realizado com discos de lixas de carbeto de silício (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) de granulação 600, a 300 rpm, sob refrigeração com água, em uma politriz circular (PoliPan-2, Pantec, São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

Antes da padronização da superfície dentinária, os tecidos pulpaes remanescentes foram removidos com o auxílio de curetas através do orifício criado na face lingual, e a câmara pulpar cuidadosamente lavada com jatos de água/ar da seringa tríplice. Após a padronização da superfície dentinária, o orifício foi preenchido com cera utilidade a fim de impedir a penetração de resina acrílica no embutimento das amostras.

As amostras de coroas bovinas foram posicionadas em um molde de silicone (Rhodorsil, Artigos Odontológicos Clássicos, Campo Limpo, SP, Brasil) de formato cilíndrico com 1,5 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro. A superfície vestibular padronizada foi posicionada sobre a base da matriz de silicone industrial Rhodorsil (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) (Figura 2B), e

esta foi totalmente preenchida com resina acrílica quimicamente ativada incolor (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Concluída a polimerização, as amostras fixadas em resina acrílica foram retiradas do molde (Figura 2C). A parte superior, onde se encontra a superfície vestibular, foi novamente polida por 1 min em uma politriz circular (PoliPan-2, Pantec, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), sob refrigeração constante, com discos de lixas de carbeto de silício (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) de granulação 600, para garantir uma superfície polida e exatamente perpendicular ao longo eixo do cilindro acrílico, além de remover os resíduos e padronizar a *smear layer*.

Figura 2 - Fluxograma do delineamento experimental

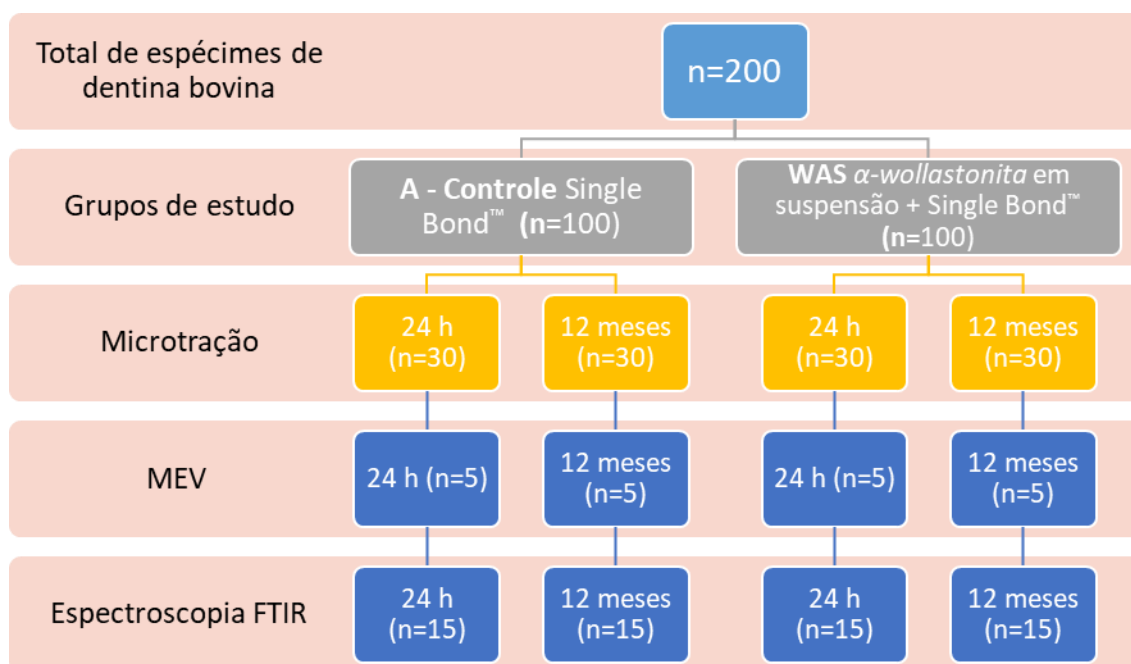


Legenda: A) face vestibular com exposição de uma área plana de dentina. B) posicionamento da amostra na matriz de silicone. C) aspecto final da amostra fixada em resina acrílica.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Determinação dos grupos amostrais

As amostras (n=200) foram divididas aleatoriamente em 2 grandes grupos (n=100), de acordo com a estratégia adesiva empregada. Na sequência os espécimes, em cada um dos grandes grupos, foram subdivididos em 2 subgrupos (n=50) de acordo com o período de armazenamento - imediato (24 h) e longitudinal (12 meses), e foram então distribuídos de acordo com diferentes testes laboratoriais a serem aplicados, como exemplificado no fluxograma (Figura 3):

Figura 3- Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: Elaborada pelo autor.

- **Grupo A:** controle (sistema adesivo Single Bond™ Universal) – n=100. Foi realizado o condicionamento da superfície com ácido fosfórico 37% (Scotchbond Universal Etchant Etching Gel, 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, USA) pela técnica do condicionamento total, por 15 s, seguido de lavagem por 30 s; remoção do excesso de umidade com papel absorvente, mantendo-se o substrato levemente umedecido; aplicação do sistema adesivo Single Bond™ Universal (3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Foi realizada a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA), com potência de 1200 mW/cm², pelo período de 10 s. Após o procedimento adesivo, um bloco de resina composta (Z250 XT, 3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, BR) com 4 mm/diâmetro e 2 mm/altura foi confeccionado sobre a superfície dentinária em incrementos de 2 mm cada, seguido de fotopolimerização por 20 s (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA). A densidade de potência foi verificada a cada dez fotopolimerizações por um radiômetro LED (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil).

- **Grupo WAS:** *α -wollastonita* em suspensão + Single Bond™ Universal - n=100.
Foi realizado o condicionamento da superfície com ácido fosfórico 37% (Scotchbond Universal Etchant Etching Gel, 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, USA) pela técnica do condicionamento total, por 15 s, seguido de lavagem por 30 s; remoção do excesso de umidade com papel absorvente, mantendo-se o substrato levemente umedecido; aplicação da suspensão de *α -wollastonita* em álcool etílico absoluto 99,5% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) ativamente por 20 s; aplicação do sistema adesivo Single Bond™ Universal (3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Foi realizada a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA), com potência de 1200 mW/cm², pelo período de 10 s. Após o procedimento adesivo, um bloco de resina composta (Z250 XT, 3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, BR) com 4 mm/diâmetro e 2 mm/altura foi confeccionado sobre a superfície dentinária em incrementos de 2 mm cada, seguido de fotopolimerização por 20 s (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA). A densidade de potência foi verificada a cada dez fotopolimerizações por um radiômetro LED (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil).

4.7 Procedimento adesivo

Realizou-se o condicionamento da superfície dentinária com ácido fosfórico 37% (Scotchbond Universal Etchant Etching Gel, 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, USA) pela técnica do condicionamento total, por 15 s, seguido de lavagem por 30 s; remoção do excesso de umidade com papel absorvente, mantendo-se o substrato levemente umedecido; aplicação do sistema adesivo Single Bond™ Universal (3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Realizou-se a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA), com potência de 1200 mW/cm², pelo período de 10 s. No grupo experimental WAS (*α -wollastonita em suspensão + Single Bond™ Universal*), a biopartícula *α -wollastonita*, em suspensão,

foi aplicada ativamente por 20 s, sobre a dentina condicionada, previamente à aplicação do sistema adesivo.

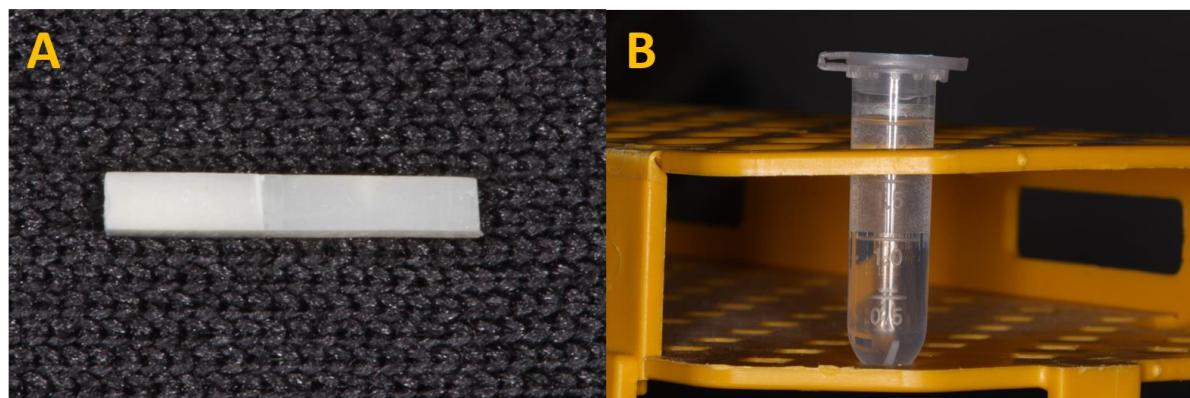
4.8 Procedimento restaurador

Para a realização do procedimento restaurador um bloco de resina composta (Z250, 3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil) com 2 mm de altura e 4 mm de diâmetro foi confeccionado sobre a face vestibular de dentina exposta. A resina foi inserida em incrementos de 2 mm, com auxílio de uma matriz de silicone industrial Rhodorsil (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil), seguido de fotopolimerização por 20 s. Para complementar a polimerização da resina, após a remoção da matriz de silicone, o bloco foi fotopolimerizado por mais 20 s em cada face. Finalizado o procedimento restaurador, as amostras confeccionadas foram armazenadas individualmente em água deionizada a 37°C por 48 h, a fim de proporcionar o tempo adequado para polimerização (Singh et al., 2010).

4.9 Teste de resistência adesiva à microtração

As amostras foram posicionadas em uma máquina para corte (Labcut 1010, Extec Technologies Inc., CT, EUA) para a realização de secções paralelas no longo eixo da coroa, em baixa velocidade e sob refrigeração abundante. Secções perpendiculares à interface adesiva, nos sentidos mésio-distal e cérvico-incisal, foram realizadas, possibilitando a obtenção de palitos retangulares de resina composta e estrutura dental com secções de aproximadamente 1 mm² de área (Figura 4A) (Sano et al., 1994).

Figura 4 - Armazenamento da amostra para envelhecimento



Legenda: A) amostra (palito) obtida após secções; B) amostra armazenada para envelhecimento
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Os palitos de resina-dentina obtidos de cada espécime foram armazenados em tubos (vol. 2 ml) do tipo Eppendorf (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração a 4 °C, em água deionizada trocada semanalmente (Figura 4B). Previamente ao ensaio de microtração, a área dos palitos foi medida com um paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itu, SP, Brasil). A resistência de união à tração foi calculada, em megapascal (MPa), por meio da fórmula: $R_m = F/A$, na qual: R_m é a resistência à microtração; F é a força aplicada, ou seja, o valor da carga (kgf) para rompimento da união adesiva; e A é a área de união (mm²). Em seguida, cada palito foi fixado pelas extremidades, com cola de cianoacrilato em gel (454, Loctite, Düsseldorf, Alemanha), em um dispositivo metálico OD03d (Odeme Equipamentos Médico e Odontológicos Ltda., Joaçaba, SC, Brasil). Para o ensaio de microtração na máquina de ensaios universal EMIC DL-1000 (Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil) foi utilizada uma célula de carga de 10 kgf, a uma velocidade de 0,5 mm/min, preconizada pela ISO/TR 11405:1994. No momento da fratura, o ensaio é interrompido automaticamente, e os valores referentes à resistência de união coletados e tabulados para a análise estatística. Os valores referentes à resistência de união em MPa foram coletados e tabelados para a realização da análise estatística.

Os palitos fraturados após a realização do teste de microtração foram analisados em estereomicroscópio X20 (Stemi 2000 – Karl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 50 vezes, para análise de fratura (Sengün

et al., 2002) Seguindo-se o seguinte padrão: 1) coesiva em resina composta: fratura predominantemente ($\geq 75\%$) no interior da resina composta; 2) coesiva em dentina: fratura predominantemente ($\geq 75\%$) no interior da dentina; 3) adesiva: fratura na interface adesivo / dentina ou na interface adesivo / resina composta, em mais de 75% da área analisada; 4) mista: fraturas sem predominância maior que 75% de qualquer tipo de falha.

Os dados resultantes de fraturas coesivas em dentina ou resina composta, e de espécimes que apresentaram falhas pré-teste foram desprezados. Apenas os dados das fraturas adesivas e mistas foram utilizados para a análise estatística (Loguercio et al., 2005; Eckert, Platt, 2007).

4.10 Análise em MEV

Para análise da interface adesiva frente às diferentes condições experimentais, cinco dentes de cada grupo foram preparados para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após terem sido restaurados seguindo a mesma metodologia empregada para o ensaio mecânico de microtração, os dentes foram seccionados perpendicularmente à interface adesiva, segundo a mesma técnica utilizada para a obtenção de palitos para microtração. Quatro palitos de cada dente seccionado foram mantidos íntegros, e tiveram suas quatro faces laterais maiores polidas com discos de lixas de carboneto de silício (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) de granulações 2000 e 4000 a 300 rpm, sob refrigeração com água. Em seguida, os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% sem sílica (Acid Gel, Villevie, Joinville, SC, Brasil) durante 15 s, e lavados com água durante 10 s, promovendo a remoção da smear layer e facilitando a visualização da interface adesiva em MEV. Os palitos restantes, obtidos de cada um dos cinco dentes representativos de cada grupo experimental, foram submetidos ao teste de microtração, tendo sido separados quatro palitos que tiveram fraturas adesivas em cada um dos grupos estudados. Os espécimes foram então mantidos em campânula de vidro com sílica por 7 dias para completa desidratação. Após, os espécimes foram montados em stubs de alumínio e, sobre suas superfícies, foi depositada, em vácuo, uma camada de 4 nm de liga de Au-Pd (Emitech SC7620 Sputter Coater, Moorestown,

NJ, EUA). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50, FEI Company, Brno - Moravia, República Tcheca) empregando aumentos de 1000, 2000 e 5000 vezes, considerando a interface adesiva.

4.11 Análise de imagens por FTIR

As análises microspectroscópicas e de imagem FTIR foram concluídas usando o sistema de imagem Spectrum Spotlight FTIR (FT-IR, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA) com ambos os modos ponto único e de imagem. O detector refrigerado a nitrogênio líquido incorpora um detector de matriz de banda estreita de mercúrio-cádmio-telureto (MCT) e detector MCT de banda média de ponto único em um único substrato. Isto proporciona a faixa de comprimento de onda de 7800 a 720 cm^{-1} , fornecendo os detalhes de impressões digitais minerais ausentes em todos os outros sistemas de imagem FTIR. Este sistema fornece resolução de pixels de 25 e 6,25 μm , e pode gerar tamanho de imagem química de até 1,64 cm^2 . As imagens foram digitalizadas entre 4000 e 720 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} , com duas digitalizações por pixel. O tamanho da imagem é de 300 por 300 μm , usando resolução de pixel de 6,25 μm . Aproximadamente 2600 espectros foram adquiridos em menos de 5 min. Uma correção de atmosfera foi aplicada à imagem bruta, subtraindo a contribuição da absorbância atmosférica, isto é, vapor de água e dióxido de carbono. As imagens foram criadas usando o software Spectrum Spotlight. Em alguns casos, espectros individuais foram extraídos de áreas selecionadas para análise mais detalhada. A banda amida I e o domínio $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ entre 1200 e 900 cm^{-1} foram deconvoluídos com o software Spectrum 3.3 (PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA). Os parâmetros de deconvolução foram: gama em 1,2 e sem suavização (comprimento=0).

4.12 Planejamento estatístico

Para o teste de resistência adesiva à microtração, a variável em estudo foi a média dos palitos de cada dente (Eckert, Platt, 2007), para cada tempo em análise. A estatística descritiva consistiu no cálculo de medias e desvios-padrão.

Os dados de resistência adesiva foram analisados, estatisticamente, quanto à sua normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov.

A estatística inferencial consistiu no teste de análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (tratamento - com ou sem *α -wollastonita*, e tempos) e no teste de múltiplas comparações de Tukey, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional: GraphPad Prism (versão 9, 2021; La Jolla, CA, EUA.).

Os dados de resistência adesiva (MPa) foram analisados em função da estimativa média e intervalo de confiança de 95% (IC) usando teste de Weibull de 2 parâmetros (Síntese 9, Weibull ++9, Reliasoft, Tucson, AZ). As curvas de probabilidade de nível de uso de Weibull foram calculadas e plotadas com o IC 90% correspondente. Além disso, a resistência adesiva (MPa) e o módulo de Weibull (m) calculados, foram representados em um gráfico de contorno, ilustrando as diferenças estatísticas entre os grupos (IC 90%). A probabilidade de falha (Pf) e o respectivo IC 90% em função dos valores de resistência adesiva à fratura (MPa). A seguinte equação e derivadas foram usadas nas análises, conforme descrito na ISO 6872:2015:

$$Pf = \exp \{ (\sigma / \sigma_0)^m \}$$

Para a análise química dos substratos em espectroscopia FTIR, a estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão. Os dados de absorbância foram analisados, estatisticamente, quanto à sua normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov.

A estatística inferencial consistiu nos testes na análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (espectros e grupos); e no teste de múltiplas comparações de Tukey, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional GraphPad Prism (versão 9, 2021; La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

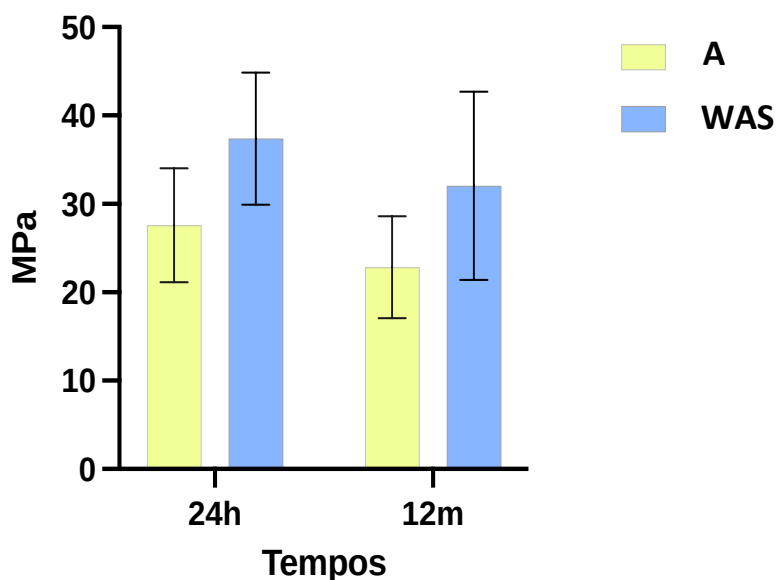
Os dados obtidos estão apresentados em três partes para melhor compreensão do leitor. Na primeira parte, apresentam-se a estatística descritiva e a estatística inferencial dos resultados obtidos no ensaio de microtração (em MPa). Na segunda parte estão as imagens da interface adesiva obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na terceira parte apresentam-se a estatística descritiva e a estatística inferencial dos resultados obtidos na análise química dos substratos em espectroscopia FTIR.

5.1 Teste de resistência adesiva à microtração

5.1.1 Estatística descritiva

A Figura 5 apresenta graficamente a análise descritiva das médias e desvios-padrão de resistência longitudinal à microtração no grupo WAS e no grupo A. A maior média ($37,39 \pm 7,48$) foi observada no grupo WAS após armazenamento por 24 h, e a menor média ($22,84 \pm 5,76$) foi apresentada pelo grupo A após armazenamento por 12 meses.

Figura 5 - Gráfico das médias e desvios-padrão em cada grupo



Fonte: GraphPad Prism.

5.1.2 Estatística inferencial

Na Tabela 1, apresentam-se os dados relativos aos efeitos dos fatores primários (tratamento e tempos) e sua interação, que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sob dois fatores. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram obtidas no fator tratamento e no fator tempo, individualmente. O resultado da interação entre os dois fatores, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), não foi estatisticamente significativo.

Tabela 1 – Resultados do teste ANOVA 2 fatores

Fatores	GL	SQ	MQ	F	p
Tratamento	1	2709	2709	44,42	<0,0001 *
Tempos	1	761,7	761,7	12,49	0,0006 *
Interação	1	2,697	2,697	0,04423	0,8338
Resíduo	116	7074	60,98		

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; p: p-valor;
 *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software GraphPad Prism.

Na tabela 2, observam-se os resultados do teste Tukey (5%). Em relação aos tempos, houve diferenças estatísticas entre 24 h e 12 meses para cada tratamento. Diante dos tratamentos, observou-se também diferenças significativas entre si.

Tabela 2 – Resultados do teste de Tukey (5%) para os fatores tratamento e tempos

Tratamento	Tempos	
	24 h	12 meses
A	27,58 ± 6,43 Aa	22,84 ± 5,76 Ab
WAS	37,39 ± 7,48 Ba	32,05 ± 10,64 Bb

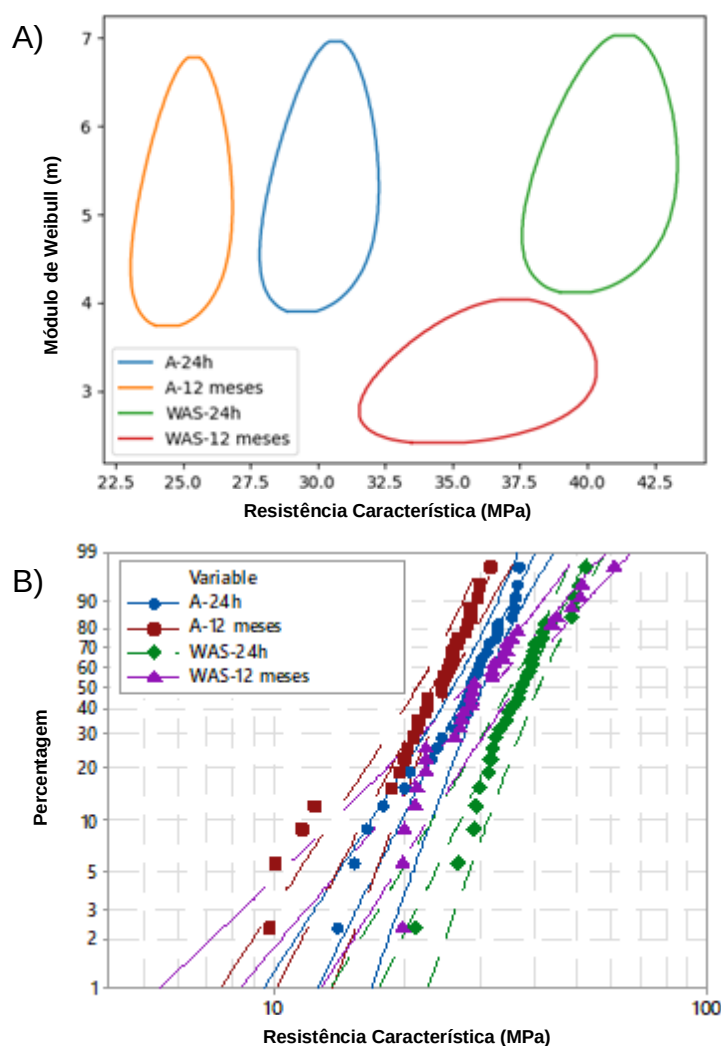
Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$); Letras maiúsculas referem-se a colunas; Letras minúsculas referem-se a linhas.

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software GraphPad Prism.

A e WAS não mostraram diferença significativa no módulo de Weibull (m) para o tempo de armazenamento de 24 h (A: 5,30 e WAS: 5,48) conforme indicado pela sobreposição entre os gráficos de contorno no eixo horizontal (Figura 6 - A) e pela tabela 3. Houve decréscimo estatisticamente significativo no valor de m para o grupo WAS após 12 meses (WAS: 3,18), embora ambos os grupos tenham apresentado redução quando comparados os tempos de armazenamento de 24 h e 12 meses (Figura 6 - A) e tabela 3. O grupo A apresentou diminuição estatisticamente significativa da resistência característica após armazenamento por 12 meses (24,92 MPa), em comparação com o armazenamento por 24 h (30,03 MPa). O grupo WAS armazenado pelo período de 24 h apresentou resistência característica

significativamente maior (40,43 MPa) que a do grupo A armazenado pelo mesmo período. A resistência característica do grupo WAS não mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre os períodos de armazenamento de 24 h (40,43 MPa) e 12 meses (35,78 MPa). Além disso, mesmo após 12 meses de armazenamento, o grupo WAS apresentou resistência característica (35,78 MPa) semelhante à apresentada pelo grupo A armazenado por apenas 24 h (30,03 MPa), conforme indicado pela Figura 6 – B, e tabela 3.

Figura 6 - Gráficos do módulo (m) e curvas de nível de probabilidade de Weibull



Legenda: A) Gráfico de contorno mostrando a relação entre o módulo de Weibull (m) e a resistência adesiva (MPa). A não sobreposição entre contornos no eixo horizontal, indica diferença estatisticamente significativa; B) curvas de nível de probabilidade de Weibull, mostrando a probabilidade de falha em função da resistência adesiva (MPa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – módulo de Weibull (m), e tensão característica (MPa) com o intervalo de confiança de 95%

Tratamento	Tempo	Módulo de Weibull	Resistência Característica (MPa)
A	24 h	5,30 (3,96 – 7,11) A	30,03 (27,98 – 32,24) A
	12 meses	5,13 (3,80 – 6,93) A	24,92 (23,17 – 26,80) B
WAS	24 h	5,48 (4,19 – 7,18) A	40,43 (37,73 – 43,32) C
	12 meses	3,18 (2,45 – 4,12) B	35,78 (31,74 – 40,33) AC

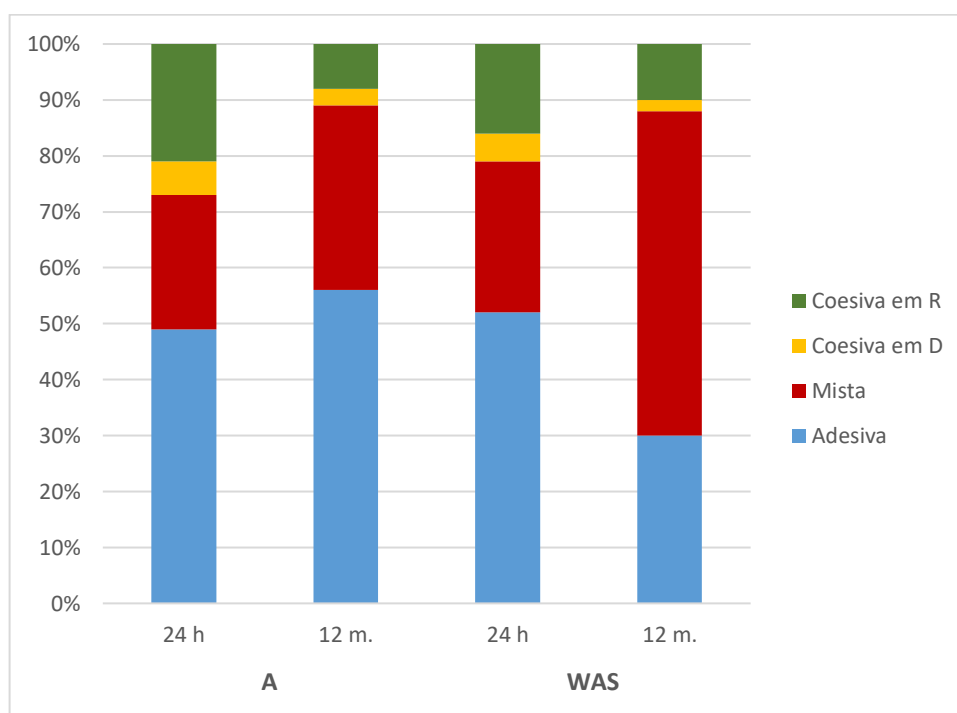
Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); Letras maiúsculas referem-se a colunas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Análise do tipo de falha

A Figura 7 ilustra graficamente a frequência, em porcentagem, dos tipos de falhas ocorridas em cada grupo. No grupo A predominaram falhas adesivas tanto para o tempo de armazenamento por 24 h quanto por 12 meses (49% e 56%, respectivamente). No grupo WAS predominaram falhas mistas (58%), após armazenamento por 12 meses. Falhas coesivas ocorreram em todos os grupos, sendo mais frequentes após armazenamento por 24 h em ambos os grupos.

Figura 7 – Gráfico de colunas da frequência (%) do padrão de fratura dos grupos experimentais



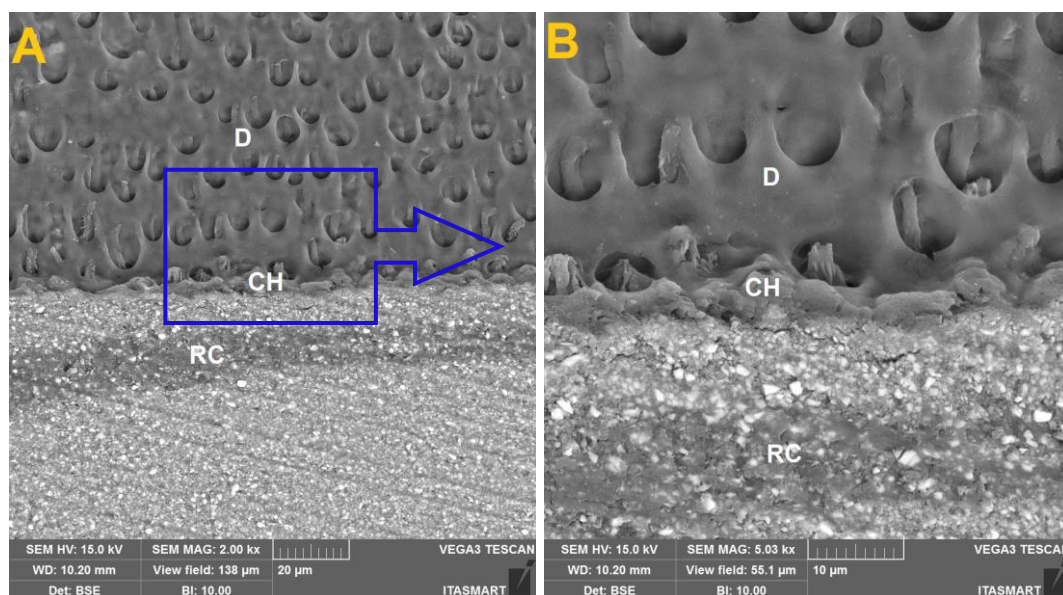
Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Imagens em MEV foram obtidas com o propósito de realizar análise complementar das características do substrato dentina com e sem a aplicação da suspensão de *α-wollastonita*.

A figura 8 ilustra a interface adesiva na dentina íntegra que não recebeu tratamento (grupo A) com o tempo de armazenamento de 24 h. Em menor aumento (2000X) (figura 8A), observa-se a formação de uma fina camada híbrida com presença de tags resinosos. A figura 8B refere-se a mesma região da figura 8A, mas em maior aumento (5000x).

Figura 8 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo A (controle) com 24 h de armazenamento

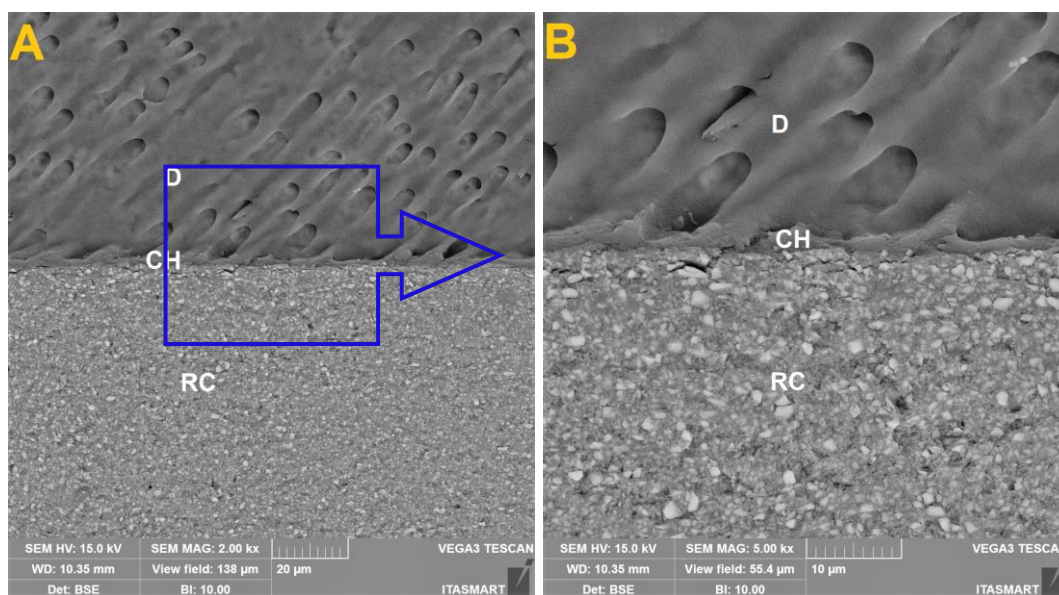


Legenda: interface adesiva entre resina composta e dentina que recebeu o Single Bond Universal, após armazenamento por 24 h; RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina; A) aumento de 2000x; B) aumento de 5000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 9 representa a interface adesiva na dentina íntegra que não recebeu tratamento (grupo A) com o tempo de armazenamento de 12 meses. Em menor aumento (2000X) (figura 9A), observa-se uma fina camada híbrida com presença de escassos tags resinosos. A figura 9B ilustra o maior aumento (5000x) da mesma região retratada na figura 9A.

Figura 9 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo A (controle) com 12 meses de armazenamento

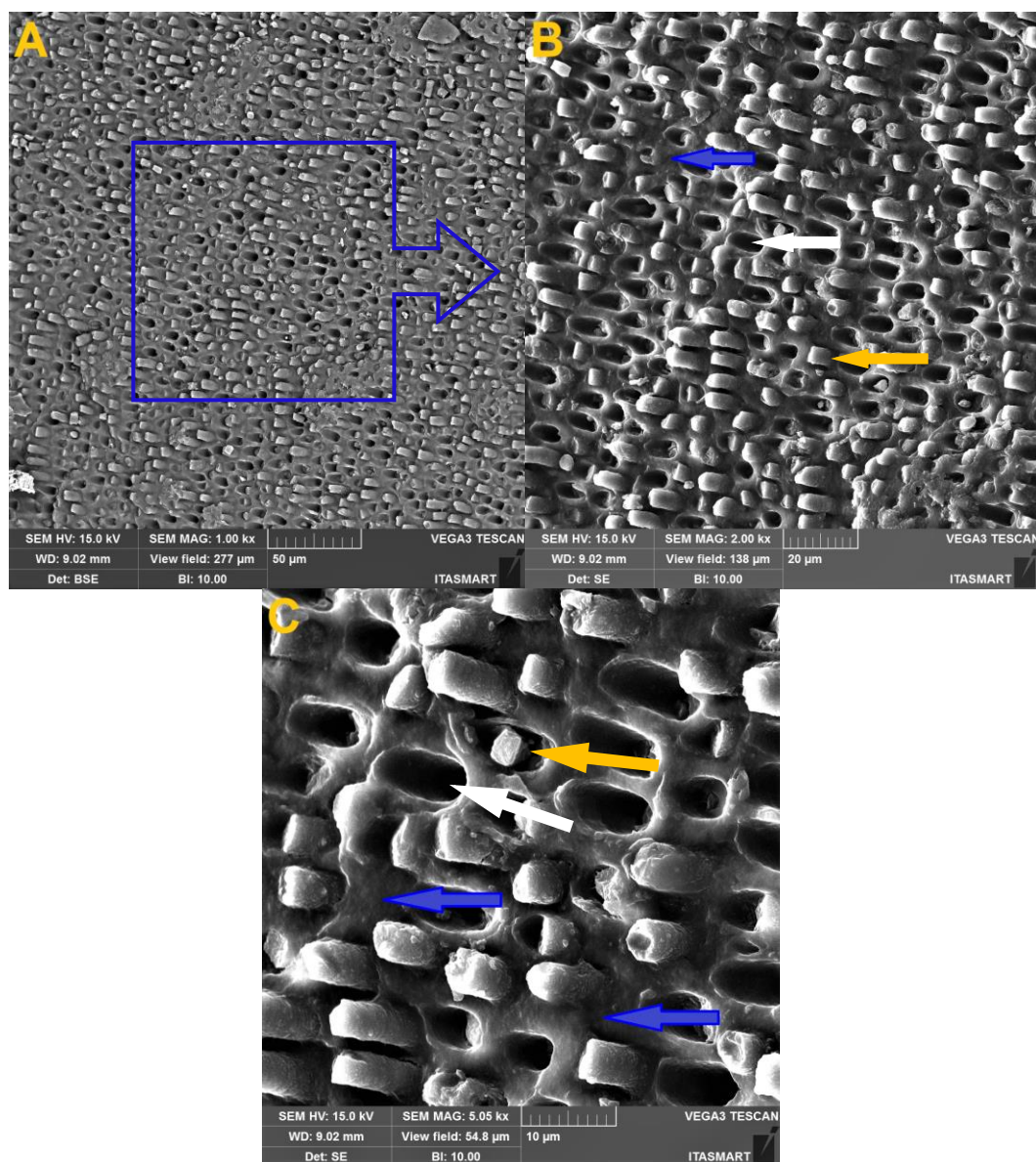


Legenda: interface adesiva entre resina composta e dentina que recebeu o Single Bond Universal, após armazenamento por 12 meses; RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina; A) aumento de 2000x; B) aumento de 5000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 10, está representada a superfície da resina composta em região onde ocorreu fratura adesiva na interface adesivo / resina composta de amostra do grupo A (controle) após 24 h de armazenamento. Nota-se o aspecto liso da superfície da resina composta e a ausência de fibrilas colágenas que possam representar porções da camada híbrida na matriz intertubular, apesar da presença de numerosos fragmentos de tags resinosos fraturados (setas amarelas) e/ou provavelmente deslocados/arrancados (túbulos vazios— setas brancas) durante o teste de microtração.

Figura 10 – Análise em MEV (1000x, 2000x e 5000x) para o grupo A (controle) com 24 h de armazenamento

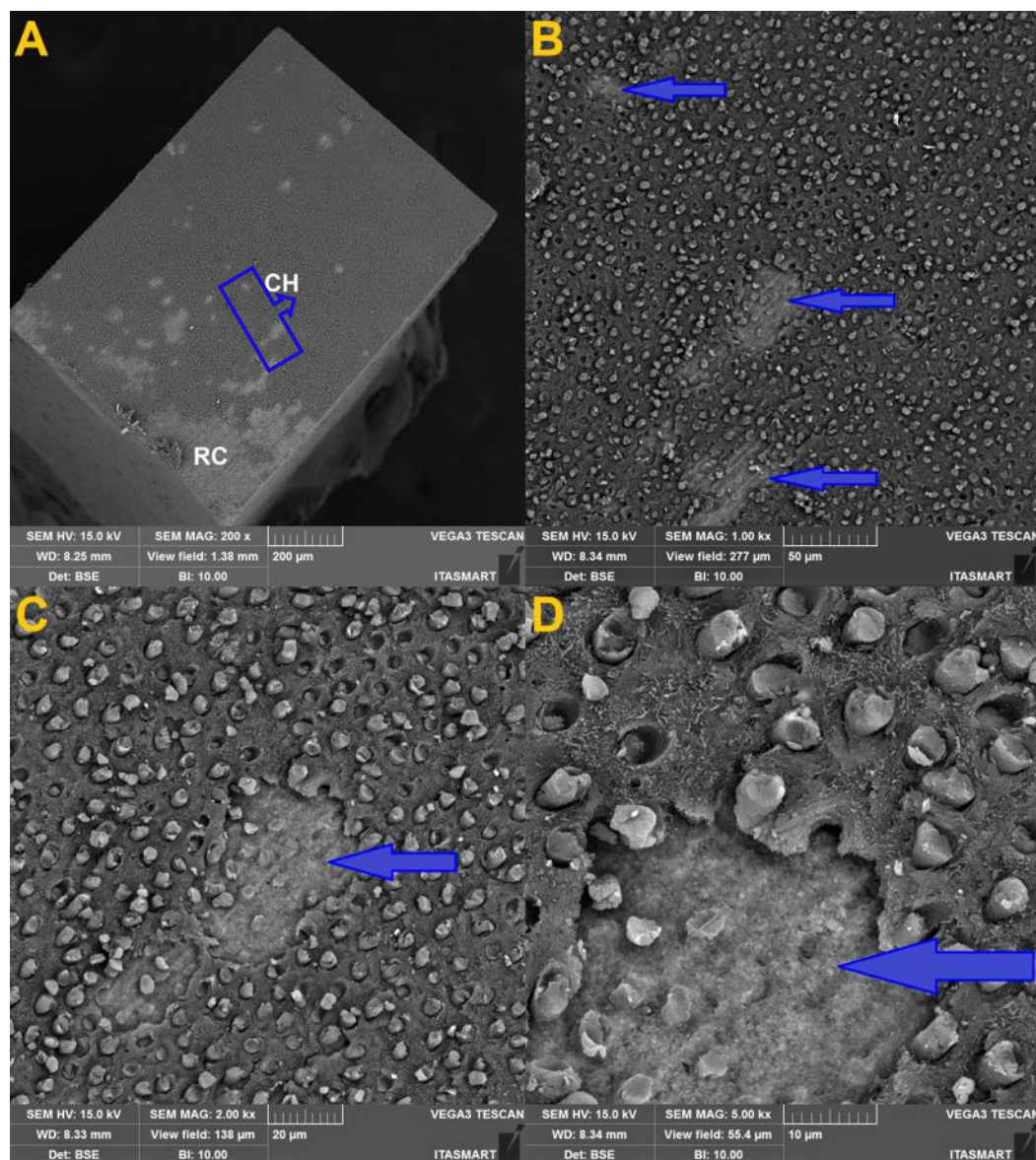


Legenda: superfície de resina composta de amostra do grupo A (controle), que recebeu o Single Bond Universal, após armazenamento por 24 h; A) interface adesiva, aumento de 1000x; B) superfície de resina composta, onde se evidencia ausência de fibras colágenas (seta azuis), tags resinosos fraturados (setas amarelas), túbulos vazios (setas brancas), aumento de 2000x; C) aumento de 5000x. Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 11, mostra a superfície da resina composta em região onde ocorreu fratura adesiva de amostra do grupo A (controle) após 12 meses de armazenamento, onde se evidencia aspecto bastante homogêneo da fratura, embora haja a presença

de áreas representativas de falhas (setas azuis), com fragmentação parcial da camada híbrida, esta se encontra íntegra em sua maior porção.

Figura 11 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo A (controle) com 12 meses de armazenamento

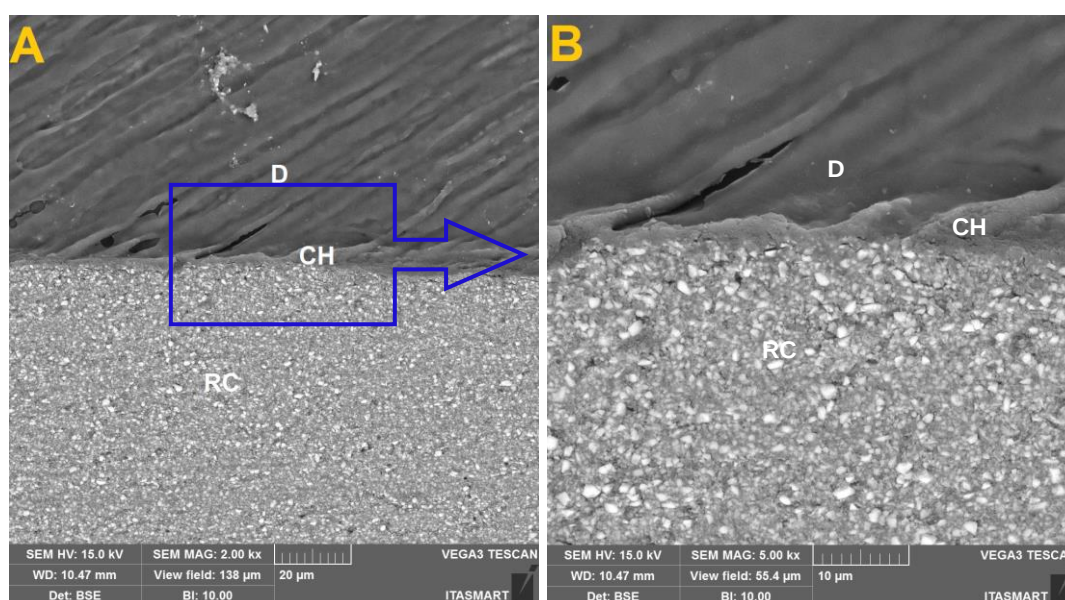


Legenda: superfície de resina composta de amostra do grupo A (controle), que recebeu o Single Bond Universal, após armazenamento por 12 meses; A) aumento de 200x; B) aumento de 1000x; C) aumento de 2000x; D) aumento de 5000x. Setas: áreas representativas de falhas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 12 ilustra a interface adesiva na dentina íntegra que recebeu tratamento de aplicação da suspensão de α -wollastonita (grupo WAS) com o tempo de armazenamento de 24 h. Em menor aumento (2000X) (figura 12A), observa-se a uma espessa camada híbrida com presença de longos tags resinosos. A figura 12B ilustra o maior aumento (5000x) da mesma região retratada na figura 12A.

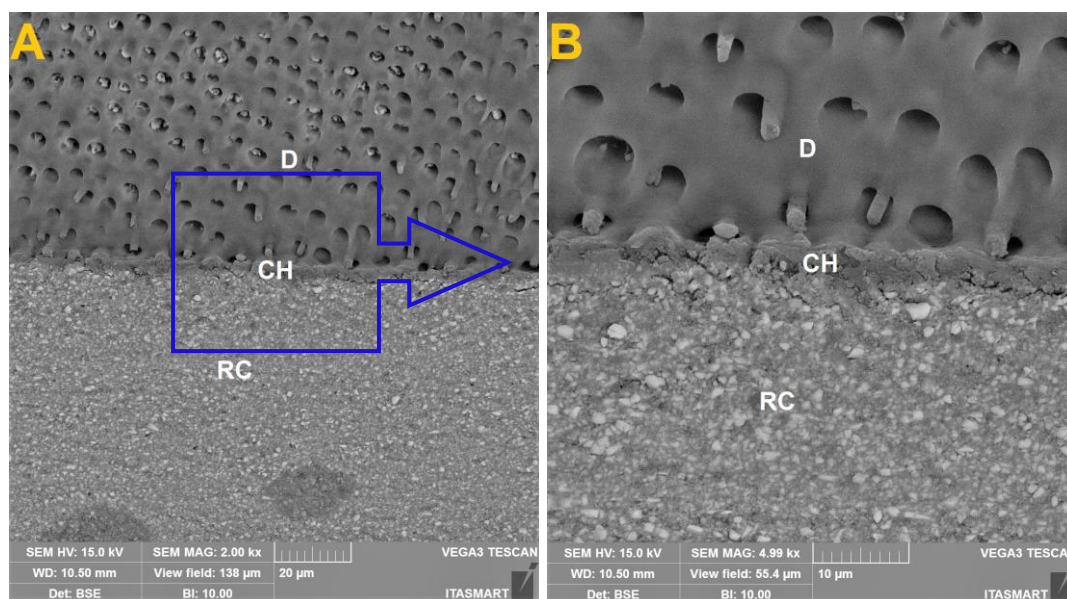
Figura 12 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo WAS com 24 h de armazenamento



Legenda: Interface adesiva entre resina composta e dentina que recebeu suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após armazenamento por 24 h; RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina; A) aumento de 2000x; B) aumento de 5000x. Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 13 representa a interface adesiva na dentina íntegra que recebeu tratamento de aplicação da suspensão de α -wollastonita (grupo WAS) com o tempo de armazenamento de 12 meses. Em menor aumento (2000X) (figura 13A), observa-se a manutenção de uma espessa camada híbrida com presença de numerosos tags resinosos. A figura 13B ilustra o maior aumento (5000x) da mesma região.

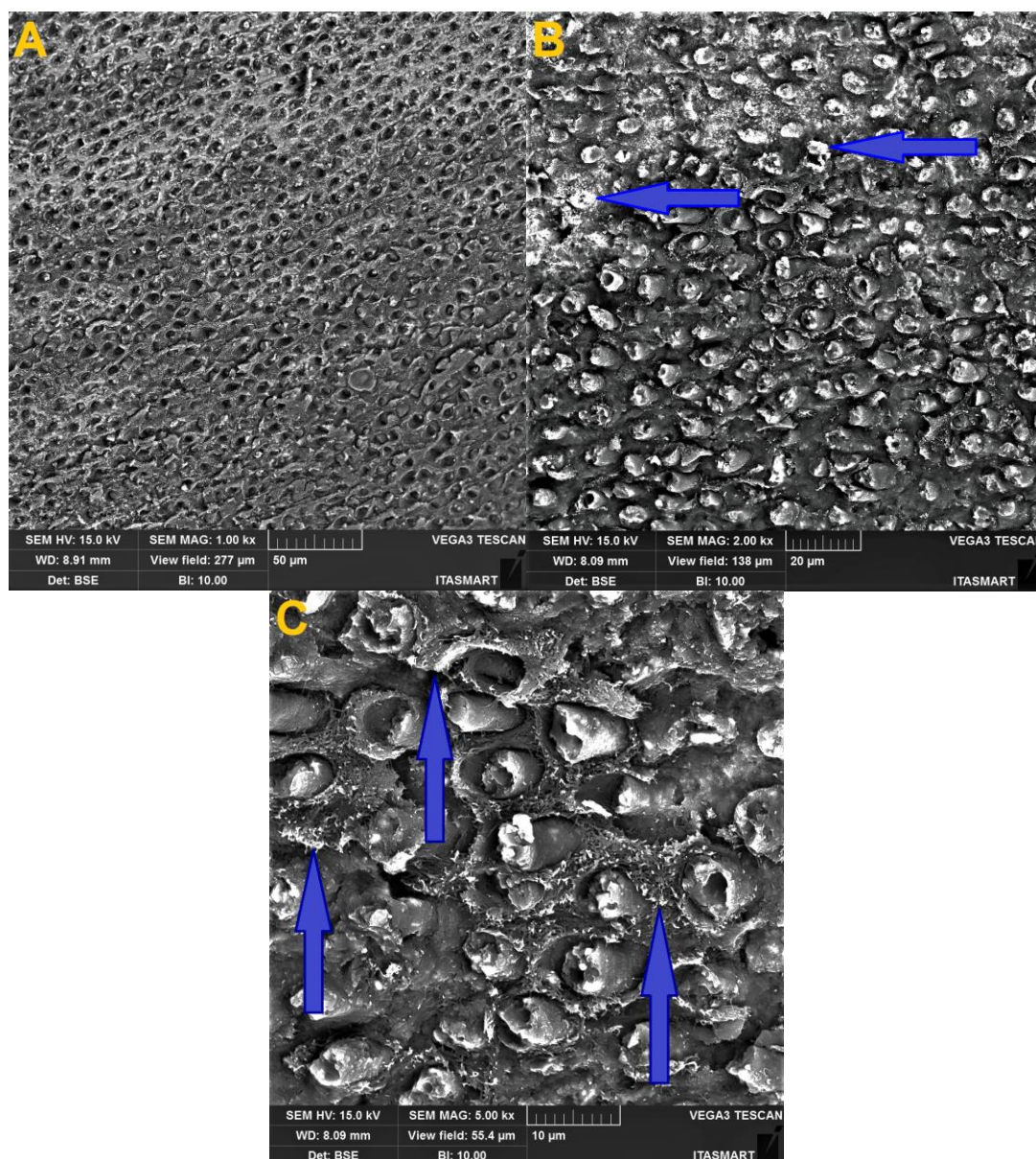
Figura 13 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo WAS com 12 meses de armazenamento



Legenda: Interface adesiva entre resina composta e dentina que recebeu suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após armazenamento por 12 meses; RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina; A) aumento de 2000x; B) aumento de 5000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 14, mostra a superfície da resina composta em região onde ocorreu fratura adesiva de amostra do grupo WAS, que recebeu suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após 24 h de armazenamento, onde se evidenciam fragmentos de numerosos de tags resinosos, além de uma expressiva presença de porções da camada híbrida na qual a rede de fibrilas colágenas foi protegida por depósitos calcificados representados pela hidroxiapatita de cálcio (setas: fig 14 - B e 14 – C).

Figura 14 – Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo WAS (controle) com 24 h de armazenamento

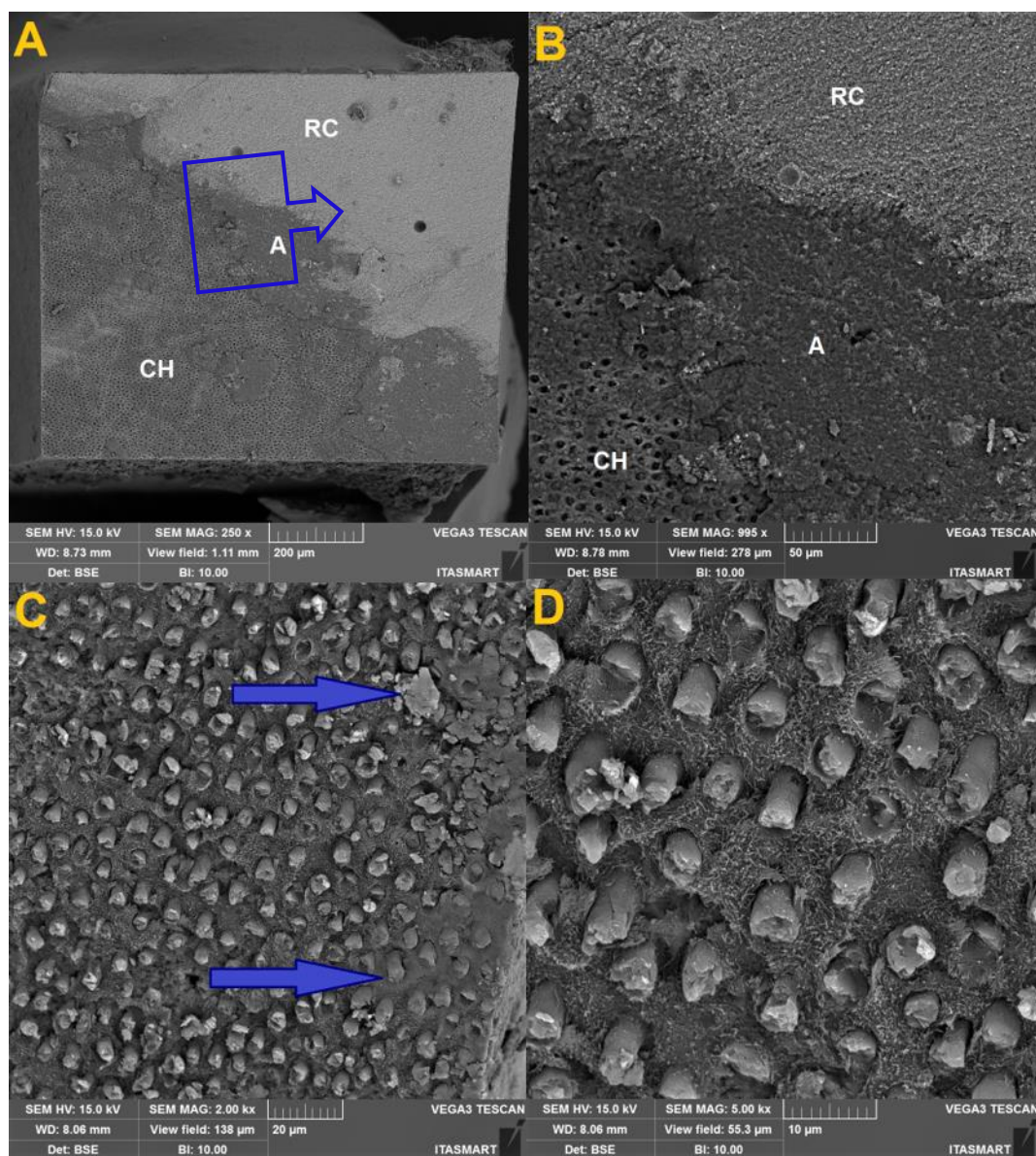


Legenda: superfície de resina composta de amostra do grupo WAS, suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após armazenamento por 24 h; ; A) interface adesiva, aumento de 1000x; B) camada híbrida onde se evidenciam fibras colágenas impregnadas com expressiva quantidade de hidróxiapatita de cálcio (setas), aumento de 2000x; C) camada híbrida onde se evidenciam fibras colágenas impregnadas com hidróxiapatita de cálcio (setas), aumento de 5000x. Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 15, está representada a região de ocorrência de fratura mista de amostra do grupo WAS, que recebeu suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após 12 meses de armazenamento, onde se observam extensas porções de camada híbrida, adesivo e resina (Figuras. 15 – A, 15

– B e 15 – C), evidenciando uma expressiva variação nos modos de falha no grupo WAS após 12 meses, apesar da formação de espessa camada híbrida composta por densa rede de fibrilas colágenas e da presença de fragmentos de numerosos de tags resinosos (Figura 15 – D).

Figura 15– Análise em MEV (2000x e 5000x) para o grupo WAS (controle) com 12 meses de armazenamento



Legenda: CH: camada híbrida; RC: resina composta. Região de fratura mista de amostra do grupo WAS, suspensão de α -wollastonita seguida da aplicação de Single Bond Universal, após armazenamento por 12 meses. A) fratura mista aumento de 250x; B) aumento de 1000x; C) aumento de 2000x; D) aumento de 5000x. Setas: áreas representativas de falhas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Análise química dos substratos em espectroscopia – FTIR

5.3.1 Estatística descritiva e inferencial

Na tabela 4, apresentam-se os efeitos dos grupos avaliados e de sua interação sobre os picos de absorvância. Segundo o teste ANOVA 2-fatores, os fatores grupos, picos e a interação apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Resultados do teste ANOVA 2 fatores

Fatores	GL	SQ	MQ	F	<i>p</i>
Picos	4	0,08198	0,02049	592,0	0,0001*
Grupos	6	0,02296	0,003827	110,6	0,0001*
Interação	24	0,1791	0,007463	215,6	0,0001*
Resíduo	315	0,01091	0,0000034		

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; p: p-valor;

*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism.

Na tabela 5 apresentam-se os valores, em absorvância (u.a), de médias, desvios-padrão e os resultados do teste de Tukey dos picos referentes ao colágeno, carbonato, fosfato, amida II e amida I obtidos nos grupos estudados, grupo A - controle (sistema adesivo Single Bond™ Universal) e grupo WAS – (α -wollastonita em suspensão + Single Bond™ Universal). Maiores médias de picos de absorvância, correspondem a maior presença dos respectivos compostos químicos no substrato analisado. Quanto ao colágeno, a maior média ($0,031477344 \pm 0,005391395$) foi observada no grupo WAS após armazenamento por 24 h, e a menor média ($0,004545521 \pm 0,001433299$) foi apresentada pelo grupo A, após armazenamento por 12 meses. Observa-se que os grupos A e WAS, armazenados por 24h, diferiram significativamente entre si, assim como dos demais grupos, evidenciando maior presença de colágeno no grupo WAS.

Relativamente aos picos de amida II e amida I, da mesma forma, as maiores médias ($0,031477344 \pm 0,005391395$) e ($0,031477344 \pm 0,005391395$), respectivamente, foram observadas no grupo WAS após armazenamento por 24 h, e as menores médias ($0,02261172 \pm 0,015539672$) e ($0,002271781 \pm 0,00289533$), respectivamente, foram apresentadas pelo grupo A após armazenamento por 12 meses. O grupo WAS (wollastonita), armazenado por 24h, apresentou o maior valor de média da absorbância para o pico de amida II, diferindo dos demais grupos; não houve diferenças significantes entre os grupos A (controle), armazenado por 24h e WAS (wollastonita), armazenado por 12 meses; e entre os grupos (A) controle, armazenado por 12 meses e WAS (wollastonita), armazenado por 12 meses; os quais diferiram significativamente dos demais grupos. O grupo WAS (wollastonita), armazenado por 24h, apresentou o maior valor de média da absorbância para o pico de amida I, e diferiu significativamente do grupo A (controle), armazenado por 12 meses; e, os grupos A (controle) armazenado por 24h e WAS (wollastonita), armazenado por 12 meses, não diferiram de nenhum grupo.

Nos picos de carbonato, embora a maior média ($0,002392773 \pm 0,001336461$) tenha sido observada no grupo A após armazenamento por 24 h, e a menor ($0,000735797 \pm 0,003083585$) no mesmo grupo após armazenamento por 12 meses, não houve diferenças significantes entre os grupos.

Por fim, no que concerne aos picos referentes ao fosfato, a maior média ($0,034794046 \pm 0,003529537$) foi observada no grupo A, após armazenamento por 12 meses, e a menor média ($0,0008333261 \pm 0,002018209$) foi observada no grupo A, após armazenamento por 24 h; não houve diferenças significantes entre os grupos A (controle), armazenado por 12 meses e WAS (wollastonita), armazenado por 12 meses, os quais diferiram significativamente dos demais grupos, evidenciando que ocorreu desmineralização de forma equivalente em ambos os grupos estudados. O grupo A (controle), armazenado por 24h, apresentou o menor valor de média da absorbância para o pico de fosfato, diferindo significativamente dos demais grupos.

Tabela 5 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da absorbância (u.a) e os resultados do teste de Tukey em cada grupo

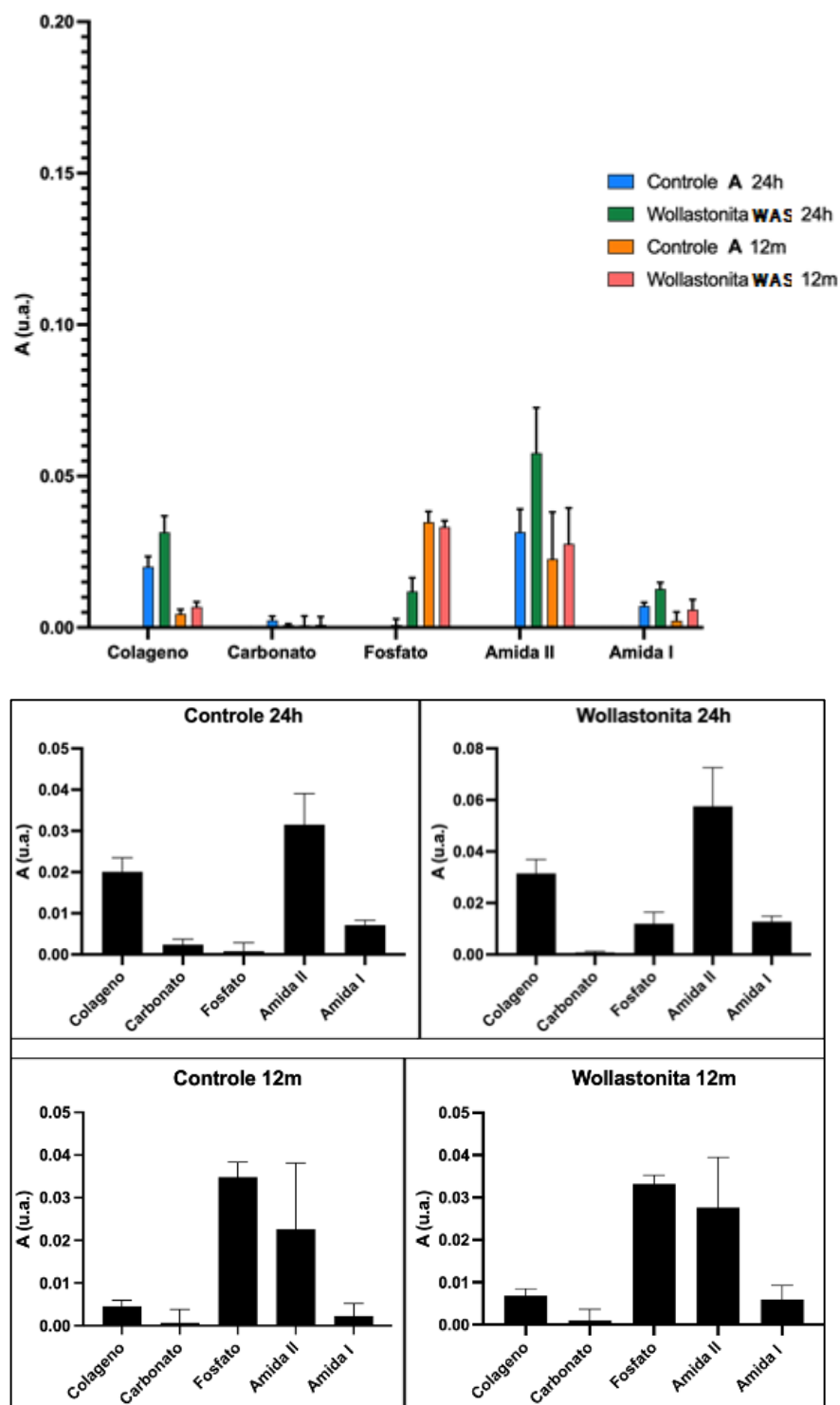
Grupos	Picos de absorbância				
	Colágeno (1140 - 1240)	Carbonato (1240 - 1550)	Fosfato (900 - 1200)	Amida II (1480 - 1600)	Amida I (1550 - 1750)
Controle (A) 24 h	0,020082161 $\pm$ 0,003382959 B	0,002392773 $\pm$ 0,001336461 A	0,000833326 $\pm$ 0,002018209 B	0,031518728 $\pm$ 0,00756218 A	0,007127947 $\pm$ 0,001186144 A B
Wollastonita (WAS) 24 h	0,031477344 $\pm$ 0,005391395 C	0,000808784 $\pm$ 0,000440349 A	0,011966208 $\pm$ 0,004442301 A	0,05758018 $\pm$ 0,01501103 B	0,012744598 $\pm$ 0,002149629 B
Controle (A) 12 m	0,004545521 $\pm$ 0,001433299 A	0,000735797 $\pm$ 0,003083585 A	0,034794046 $\pm$ 0,003529537 C	0,02261172 $\pm$ 0,015539672 C	0,002271781 $\pm$ 0,00289533 A
Wollastonita (WAS) 12 m	0,006799152 $\pm$ 0,001684085 A	0,000933142 $\pm$ 0,002704351 A	0,033193206 $\pm$ 0,00208192 C	0,027659346 $\pm$ 0,011828533 A C	0,005919015 $\pm$ 0,0033112 A B

Legenda: *As médias acompanhadas de letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$). Letras maiúsculas referem-se à colunas.

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software IR-Hard Tissue.

A Figura 16 apresenta graficamente a análise descritiva das médias e desvios-padrão de absorbância (u.a), evidenciando as diferenças obtidas entre os grupos experimentais.

Figura 16 - Gráficos das médias e desvio-padrão dos picos de absorvância em cada grupo



Fonte: GraphPad Prism.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

Para a realização deste estudo, após revisão de literatura, optou-se pela utilização de dentes bovinos, uma vez que a unidade experimental proposta foi composta de 200 elementos dentais hígidos, número considerado elevado e preocupante para obtenção de dentes humanos, em conformidade com a política de vigilância dos comitês de ética em pesquisa.

De acordo com Yassen et al. (2011) os dentes bovinos são de fácil obtenção em grandes quantidades, geralmente se encontram em boas condições e apresentam composição mais uniforme em comparação a dentes humanos, pela maior facilidade de padronização pela obtenção de animais de mesma idade e condições de alimentação. Os dentes bovinos apresentam ainda superfície plana larga, e apresentam menor incidência de defeitos estruturais que possam comprometer os resultados das pesquisas. Além disso não foram encontradas diferenças entre a matriz mineral dos tecidos duros dentários humano e bovino (Bachmann et al., 2003).

O sistema adesivo Single Bond Universal® pode, em dentina, ser aplicado pela técnica do condicionamento ácido total (em dois passos), ou como sistema adesivo autocondicionante (em passo único). Nesse estudo, optou-se pelo condicionamento ácido total, por 15 s com ácido fosfórico a 37%, seguido de lavagem abundante por 30 s e remoção do excesso de umidade com papel absorvente, mantendo-se o substrato levemente umedecido.

O condicionamento com ácido fosfórico a 37% em peso por 15 s promove a remoção de toda a fase mineral da *smear layer* e, adicionalmente, desmineraliza 5 µm de espessura da superfície dentinária, expondo uma malha fibrilar de colágeno tipo I com espaços de cerca de 30 ± 11 nm entre as fibrilas colágenas (Talungchit et al., 2014; Frassetto et al., 2016). Esses espaços interfibrilares atuam como vias de difusão para que monômeros adesivos permeiem a rede de fibrilas colágenas expostas, formando a camada híbrida (Nakabayashi et al., 1982). As dimensões, entre 20 a 30 µm, da biopartícula *α-wollastonita*, empregada neste estudo, favorece a prevenção da obliteração de tais espaços interfibrilares, assim como dos túbulos dentinários, pela

mesma. Dessa forma, o emprego da α -wollastonita não prejudica a infiltração do adesivo entre a rede de fibrilas colágenas expostas, na formação da camada híbrida, ou nos túbulos dentinários, que têm diâmetro entre 1 e 3 μm (Goldberg et al., 2011; Tjäderhane et al., 2012), na formação de tags resinosos.

O adesivo Single Bond Universal, é composto por BisGMA e HEMA, além dos solventes água e etanol. De acordo com Tay et al. (1996), a presença de água em sua composição reduz a sensibilidade da técnica, minimizando a variabilidade dos resultados de resistência adesiva por eventuais diferenças de umidade no substrato. Nesse estudo, foram aplicadas 2 camadas consecutivas de adesivo de forma ativa, por 15 s, seguidas de um breve jato de ar, a uma distância padronizada de 10 cm, por 5 s visando a evaporação do solvente. Para evitar espessura exagerada da camada de adesivo o que, de acordo com D'Arcangelo et al. (2009), poderia reduzir os valores de resistência adesiva, os excessos foram removidos com um aplicador *microbrush* por 4 vezes. Esses passos são importantes para a padronização da camada de adesivo previamente à fotopolimerização por 20s.

Embora os sistemas adesivos apresentem significativa evolução ao longo do tempo, a interface adesiva ainda representa o aspecto mais crítico para a estabilidade e longevidade de uma restauração adesiva em dentina (Spencer et al., 2010, 2012; Amaral et al., 2016), sendo a água, presente intrinsecamente no substrato via fluido dentinário, ou advinda da cavidade bucal pela presença da saliva e/ou dieta alimentar, o principal fator diretamente relacionado ao processo de degradação dessa interface (Ferracane, 2006; Kostoryz et al., 2009; Mobarak, Daifalla, 2012). Para simular essa degradação em estudos laboratoriais, são propostas na literatura, diferentes técnicas de envelhecimento artificial, como a armazenagem em água, saliva natural ou artificial, solução salina ou outras substâncias solventes orgânicas (Yamauti et al., 2003; De Munck et al., 2003).

O armazenamento em água foi o modelo de envelhecimento artificial adotado neste estudo por representar o meio de armazenagem mais comum em estudos da degradação da interface adesivo-dentina (Deng et al., 2014). Métodos, como o armazenamento em água, que simulam o ambiente intraoral úmido, onde restaurações estão sempre envoltas em saliva, fornecem um meio rápido e padronizado de avaliar a longevidade da união entre materiais restauradores e substrato dental, auxiliando na previsibilidade de seu desempenho clínico (Erhardt et al., 2008c; Deng et al., 2014; Takamizawa et al., 2015). Adicionalmente, tais métodos

laboratoriais, apresentam baixo custo e execução simples, em comparação com ensaios clínicos de longa duração, que podem ser caros e de difícil padronização (Takamizawa et al., 2015).

Após extensa revisão de literatura, neste estudo optou-se pela secção das amostras após os procedimentos adesivo e restaurador e, portanto, pela armazenagem dos palitos obtidos (armazenagem direta), posteriormente submetidos a ensaio de microtração. Essa opção se baseou, essencialmente, em numerosos relatos na literatura (Abdalla, Feilzer, 2008; Hashimoto et al., 2002; Loguercio et al., 2005; Marchesi et al., 2014; Toledano et al., 2007), evidenciando que, no armazenamento direto, como a área transversal da amostra é reduzida, a distância e o tempo de difusão do solvente através da interface adesiva são menores, acelerando a degradação, diminuindo significativamente a resistência adesiva, e aumentando a nanoinfiltração (Armstrong et al., 2010; Hashimoto et al., 2002, 2003; Abdalla, Feilzer, 2008; Marchesi et al., 2014). Representando, dessa forma, desafio maior e mais uniforme à resistência adesiva dos espécimes testados.

Comumente, após o envelhecimento simulado, uma restauração adesiva é avaliada por meio de teste de resistência de união à microtração (μ -TBS) (Sano et al., 1994; Loguercio et al., 2005; Camargo et al., 2007; Takamizawa et al., 2015; Armstrong et al., 2017; Shibata et al., 2016), sendo esse método bastante consagrado pela literatura, seguido neste estudo.

As limitações quanto à longevidade e a conservação da adesão em dentina são vastamente relatadas na literatura (Pashley, Carvalho, 1997; Spencer, Wang, 2002; Carrilho et al., 2005; Spencer et al., 2010, 2012; Sartori et al., 2015; Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015; Tjäderhane, 2015; Frassetto et al., 2016; Carvalho, Manso, 2016; Song et al., 2019) representando um desafio permanente à comunidade científica, uma vez que, nas restaurações adesivas, os valores de resistência de união à dentina sofrem redução significativa e a interface adesiva se torna passível de degradação ao longo do tempo. Essa degradação aparece vinculada à ação da água endógena e exógena e à ação das enzimas proteolíticas/hidrólise nos diferentes estudos (Carrilho et al., 2005; Frassetto et al., 2016; Mazzoni et al., 2015; Nakajima et al., 2011; Pinna et al., 2015; Reis et al., 2013). A água hidrólise ligações peptídicas da matriz colágena, resultando na diminuição progressiva das propriedades mecânicas da interface, favorecendo sua degradação ao longo do tempo (Carrilho et al., 2005).

Diante de tal conjuntura, diversos estudos propõem a associação de partículas bioativas a sistemas adesivos objetivando uma interface adesiva mais longa pela preservação do colágeno ou inibição das enzimas (Profeta et al., 2012, 2013; Sauro et al., 2012; Zhang et al., 2015).

À medida que novos materiais e técnicas são implementados no campo da adesão em odontologia restauradora, torna-se primordial a realização de pesquisas em substrato dentinário. Buscando contribuir com a melhor compreensão das possíveis interações entre sistemas adesivos e biopartículas, este estudo avaliou a ação da *α -wollastonita* na resistência longitudinal de união e características da interface adesiva em dentina.

Embora não haja na literatura consenso quanto à melhor forma de incorporação de biopartículas (Bedran-Russo et al., 2014); se aos sistemas adesivos ou ao protocolo adesivo na forma de pré-tratamento do substrato dentinário; neste trabalho de pesquisa, após numerosos testes realizados em estudo piloto, optou-se pela aplicação da biopartícula na forma de suspensão em etanol absoluto, sobre a dentina previamente condicionada com ácido fosfórico na concentração de 37% em peso, por ter sido esta modalidade de aplicação, a que não ocasionou qualquer alteração das propriedades físicas do sistema adesivo comercial adotado neste estudo e, principalmente, preveniu qualquer interferência com a translucidez do mesmo. Também através de estudo piloto, foi encontrada a concentração de 10% em peso da biopartícula aplicada na formulação da suspensão em etanol absoluto 99,5%, por meio da qual foram obtidos os melhores resultados de resistência adesiva à microtração.

A biopartícula *α -wollastonita* empregada neste estudo (figura 17 – A), diferentemente da sua forma convencional, encontrada na natureza (figura 17 – B), além de ser uma partícula relativamente grande, com dimensões entre 20 e 30 μm , se apresenta como uma partícula mesoporosa, o que lhe confere maior área de superfície, possibilitando que reaja de forma extremamente rápida, com o ácido fosfórico residual proveniente do condicionamento dentinário total, formando uma rede de cristais de hidroxiapatita de cálcio sobre a superfície dentinária previamente condicionada. Esta capacidade de rapidamente reagir com o ácido fosfórico, possibilitou a incorporação dessa biopartícula como pré-tratamento ao protocolo adesivo.

A α -wollastonita apresenta excelentes propriedades bioativas no reparo de tecidos duros humanos, dos quais é um por exemplo a dentina (Aly et al., 2016; Cerruti, Sahai, 2006; Nuñez-Rodriguez et al., 2018). Além de biocompatível, a α -wollastonita tem características bioativas similares às da hidroxiapatita, e quando em contato com fluidos corporais, como o fluido dentinário, tem a capacidade de formar sobre a superfície dentinária condicionada, uma rede de cristais de hidroxiapatita de cálcio (Ebisawa et al., 1990; Nuñez-Rodriguez et al., 2018). E essa expressão da bioatividade da α -wollastonita, formando uma camada de cristais de hidroxiapatita, se deve, em grande parte, à morfologia superficial dessa biopartícula, por apresentar porosidade superficial (Cerruti, Sahai, 2006; Nuñez-Rodriguez et al., 2018). A porosidade permite a penetração dos fluidos corporais na partícula de α -wollastonita, influenciando diretamente nas suas propriedades bioativas, pois leva ao crescimento de cristais de hidroxiapatita de cálcio de dentro para fora, resultando em propriedades bioativas mais eficientes (Choudhary et al., 2016; Nuñez-Rodriguez et al., 2018), além de aumentar a velocidade da reação química, causando rápida formação de apatita (Choudhary et al., 2016).

Figura 17 – Análise em MEV (10000x) da superfície da biopartícula α -wollastonita



Legenda: superfície da biopartícula α -wollastonita. A) α -wollastonita sintética utilizada neste estudo, aumento de 10000x; B) α -wollastonita natural, aumento de 10000x. Pode-se observar em A, a intensa porosidade que confere à biopartícula a sua principal propriedade, que é a capacidade de reagir rapidamente com o ácido fosfórico.

Fonte: imagens cedidas por Dr. Tiago Moreira Bastos Campos, engenheiro químico responsável pela síntese da biopartícula.

6.2 Dos Resultados

O sistema adesivo, além de unir dente e material restaurador resinoso, representa uma barreira de proteção à estrutura de colágeno exposta pelo condicionamento ácido, contra a ação de ácidos de origem bacteriana, a degradação enzimática e a degradação hidrolítica (Liu et al., 2011; Osorio et al., 2014; Spencer et al., 2010; Zhang et al., 2015).

De acordo com relatos prévios, a resistência de união em dentina pode tanto ser afetada positivamente, pela associação ao protocolo adesivo, de biopartículas, como as de silicato, capazes de promover a remineralização dentinária (Tay, Pashley, 2008; Profeta, 2012, 2013; Sauro et al., 2012; Zhang et al., 2015; Song et al., 2019); quanto negativamente, pelo tempo de armazenamento em água deionizada (Kato, Nakabayashi, 1998; Kitasako et al., 2000; Hashimoto et al., 2002; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008; Zhang, Xu, 2008; Deng et al., 2014; Reis et al., 2015). Um dos principais fatores que atuam na redução da resistência adesiva em dentina, ao longo do tempo, é a degradação do colágeno (Profeta, 2012, 2013; Sauro et al., 2012; 2013; Zhang et al., 2015), seja pela ação de enzimas, como as MMPs (degradação enzimática) (Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015; Reis et al., 2013; Tjäderhane et al., 2013, 2015); seja por ação da água (degradação hidrolítica) (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2005; Erhardt et al., 2008a; Carvalho et al., 2013; Pinna et al., 2015). A prevenção da degradação do colágeno ao longo do tempo, portanto, trará maior estabilidade à camada híbrida, e longevidade à resistência adesiva em dentina (Tay, Pashley, 2008; Zhang et al., 2015).

No presente estudo, a maior média de resistência adesiva à microtração foi observada no grupo WAS, que recebeu suspensão de *α -wollastonita* seguida da aplicação de Single Bond Universal, após 24 h de armazenamento em água deionizada. Enquanto a menor média, foi verificada no grupo A (controle), armazenado em água deionizada por 12 meses. Ainda em relação a resistência adesiva à microtração, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas não apenas entre tratamentos e tempo, individualmente (tabela 1); mas também, nos tempos para cada um dos grupos, e nos tratamentos entre si (tabela 2), com o grupo WAS apresentando maior resistência adesiva em comparação com o grupo A, tanto após 24 h, como após 12 meses de armazenamento. É de extrema relevância

destacar que, mesmo após o armazenamento por 12 meses, o grupo WAS, no qual foi aplicada a α -wollastonita, apresentou média de resistência adesiva estatisticamente significante maior que a apresentada pelo grupo A, mesmo quando este último foi armazenado por apenas 24 h. Desta forma, a primeira hipótese de nulidade — a aplicação de biopartícula pseudowollastonita (α -wollastonita), na forma de suspensão (etanol 99,5% + 10% de biopartícula em peso) na superfície dentinária previamente condicionada com H_3PO_4 a 37%, não influencia a resistência imediata e longitudinal de união, deve ser rejeitada.

As possíveis explicações para tão evidente efeito positivo no aumento da resistência adesiva, bem como na sua manutenção ao longo do tempo, promovido pela aplicação da biopartícula α -wollastonita, encontram amplo respaldo na literatura (Cerruti, Sahai, 2006; Núñez-Rodríguez et al., 2018; Profeta, 2012, 2013; Sauro et al., 2012; 2013; Zhang et al., 2015). Partículas de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita, remineralizam a dentina após o condicionamento ácido total, melhorando a longevidade da restauração (Tay, Pashley, 2008; Zhang et al., 2015). Agentes, como a α -wollastonita, com capacidade de liberar íons Ca^{2+} e induzir a liberação PO_4^{3-} (ao reagir com o H_3PO_4 residual) em níveis elevados, têm consequentemente, o potencial de estimular a remineralização da dentina (Chen et al., 2014; Profeta et al., 2012; Zhang et al., 2015), protegendo o colágeno exposto na camada híbrida, melhorando a estabilidade e a longevidade da adesão (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2015). A incorporação de minerais na camada híbrida auxilia também, no reparo de falhas nanométricas, minimizando a ocorrência de nanoinfiltração (Zhang et al., 2015). Adicionalmente, a camada híbrida remineralizada pode ser mais resistente à degradação no meio bucal e ser capaz de resistir e neutralizar os ácidos de origem bacteriana (Liu et al., 2011; Osorio et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Núñez-Rodríguez et al. (2018), descrevem a wollastonita como um silicato de cálcio biocompatível, com características bioativas semelhantes às da hidroxiapatita. O que a coloca na vanguarda dos minerais de reforço, como um importante biomaterial, a ser utilizado na forma de pó (ou suspensão, como neste estudo), para reparar lesões relacionadas aos tecidos duros humanos. Os autores destacam que a partícula de α -wollastonita sintética, como a empregada neste estudo, apresenta como característica especial, uma adequada porosidade superficial, que influencia diretamente sua bioatividade, por permitir a penetração de fluidos corporais, como o fluido dentinário, levando à formação de uma camada de novos cristais de

hidroxiapatita, que crescem do interior da partícula em direção à superfície, resultando em propriedades bioativas mais eficientes.

Ainda mais interessante, é o fato de que, como a *α-wollastonita* é um silicato de cálcio, os íons Si reagem com grupamentos OH^- , formando grupamentos silanol (Si-OH) que são agentes catalizadores para a nucleação e para o crescimento dos cristais de hidroxiapatita neoformados (Choudhary et al., 2016; Kokubo, 1998; Nuñez-Rodriguez et al., 2018). Uma vez formados, os núcleos de apatita podem crescer espontaneamente, consumindo os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} (Kokubo, 1998). Esta apatita, inicialmente amorfa, transforma-se posteriormente em hidroxiapatita (Choudhary et al., 2016).

A hidroxiapatita formada a partir da reação da *α-wollastonita*, é similar à biológica que compõe os tecidos duros humanos, isso possibilita uma união direta através de uma forte ligação química entre a hidroxiapatita neoformada e o tecido duro humano (dentina) (Chang, Chen, 2008; Choudhary et al., 2016; Ebisawa et al., 1990; Kokubo, 1998; Nuñez-Rodriguez et al., 2018).

Em relação a essa forte união direta entre tecidos duros humanos e a hidroxiapatita neoformada, Sauro et al. (2012) afirmam que o ácido silícico Si(OH)_4 (também formado no meio biológico quando da reação da *α-wollastonita* com H_3PO_4), é quimicamente adsorvido dentro da rede de fibrilas colágenas expostas pelo condicionamento ácido total, formando uma ligação eletrostática na superfície do colágeno, orientando a formação de uma rede forte e consistente de cristais de hidroxiapatita de cálcio justamente sobre o colágeno exposto. Dessa forma, a alocação da hidroxiapatita neoformada não ocorre ao acaso, mas é, de fato, direcionada de maneira otimizada, à superfície das fibrilas colágenas expostas; protegendo-as, tanto contra a degradação enzimática, pela ação de MMPs, quanto contra a degradação hidrolítica.

É ainda importante ressaltar que, o mecanismo de reação da *α-wollastonita*, com liberação de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} , e OH^- causa uma elevação do pH do meio, tornando a interface adesiva moderadamente alcalina, o que favorece a inibição de MMPs pH dependentes (Sauro et al., 2012). A combinação de um meio mais alcalino, inibindo a ação de MMPs, e a precipitação de cristais de hidroxiapatita de cálcio, seria a razão para os maiores valores nas médias de resistência adesiva à microtração (Profeta et al., 2012; Sauro et al., 2012; Zhang et al., 2015), principalmente após 24 h de armazenamento; com importante redução da resistência adesiva à microtração ao

longo de 3 meses de armazenamento (Sauro et al., 2012). Essas informações corroboram com os achados de nosso estudo.

De acordo com os resultados obtidos através da análise química dos substratos por espectroscopia FTIR (tabela 5), a maior média para os picos de absorbância do colágeno foi verificada no grupo WAS, tratado com a *α-wollastonita*, após armazenamento por 24 h. Mostrando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e evidenciando que houve conservação do colágeno no grupo tratado com a *α-wollastonita*. Da mesma forma, as maiores médias, tanto para os picos de amida I, quanto de amida II, foram encontrados no grupo WAS, após armazenamento por 24 h, diferindo significativamente das médias observadas no grupo controle, após armazenamento por 24 h. A redução nos picos de amida insinua a degradação das fibrilas colágenas (Maske et al., 2015). Tais resultados endossam os achados da literatura (Profeta et al., 2013; Sauro et al., 2012), os quais evidenciam aumento na resistência adesiva quando há preservação do colágeno relacionada ao tratamento com biopartículas.

A redução do conteúdo mineral representada por menores médias dos picos de fosfato e carbonato associa-se ao processo cíclico da desmineralização-remineralização, indicando que estes grupos são dissolvidos ao longo do tempo de armazenamento (Wang et al., 2007). Os resultados das análises em FTIR, evidenciaram, após armazenamento por 24 h, picos de fosfato significativamente menores no grupo A (controle), em comparação com o grupo WAS; comprovando maior desmineralização do grupo controle. Após 12 meses, não houve diferenças estatísticas entre os grupos, evidenciando equilíbrio no processo de desmineralização - remineralização ao longo do tempo.

Quanto aos picos de carbonato, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados em ambos os períodos de armazenamento. Com base no estudo de Nuñez-Rodriguez et al. (2018) a desmineralização da superfície, por exemplo por meio do condicionamento ácido, aumenta a supersaturação local desses íons (Ebisawa et al., 1990; Nuñez-Rodriguez et al., 2018), o que eleva o pH do meio. Há então, a reação da *α-wollastonita*, consumindo os íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , resultando na precipitação da rede de hidroxiapatita de cálcio. A hidroxiapatita de cálcio é uma hidroxiapatita contendo carbonato de cálcio (Ebisawa et al., 1990; Kokubo, 1998; Nuñez-Rodriguez et al., 2018). Embora os íons cálcio também sejam consumidos pela reação de formação da hidroxiapatita, a

dissolução dos grupamentos carbonato de cálcio é maior que seu consumo (Nuñez-Rodriguez et al., 2018; Kokubo, 1998); consequentemente, a concentração do carbonato continua a aumentar, mesmo após armazenamento por apenas 24 h.

Os resultados da análise dos substratos por MEV, assim como observado por Profeta et al. em 2012, evidenciam a deposição de cristais de hidroxiapatita sobre a dentina tratada com a biopartícula (grupo WAS) onde, após 24 h, se evidencia camada híbrida espessa (figura 12), na qual a rede de fibrilas colágenas foi protegida por depósitos calcificados representados pela hidroxiapatita de cálcio (figura 14). Coincidindo com a formação de tags resinosos mais numerosos e longos (figura 12), em comparação com o grupo controle, onde se observa camada híbrida delgada e tags resinosos curtos (figura 8). Após 12 meses, o padrão mais espesso da camada híbrida do grupo WAS foi mantido (figura 13), em comparação com o grupo controle (figura 9). Nota-se ainda, no presente estudo, a ação fixadora da suspensão contendo *α -wollastonita*, proporcionando, no grupo WAS, a manutenção, mesmo após 12 meses, de uma densa rede de fibrilas colágenas exuberantes e a presença de fragmentos de numerosos de tags resinosos (figura 15), em comparação com o grupo controle; que após o mesmo período, apresentou áreas expressivas de falhas e fragmentação da camada híbrida (figura 11).

A adequada formação da camada híbrida, principal mecanismo de retenção dos sistemas adesivos à dentina, representa uma variável importante na durabilidade e eficácia da adesão. Embora a espessura da camada híbrida formada e a profundidade dos tags resinosos não se correlacionem com os valores de resistência de união (Finger et al., 1994; Nakajima et al., 1995; Prati et al., 1998; Xuan et al., 2010), a literatura sugere uma possível relação entre qualidade da hibridização e resistência adesiva (Finger et al., 1994). No presente estudo, os resultados apresentados pela análise dos substratos por MEV, evidenciam melhor qualidade da hibridização no grupo WAS, em comparação com o grupo controle, como relatado anteriormente. Essa percepção se faz ainda mais evidente quando, após apenas 24 h de armazenamento, nota-se o aspecto liso da superfície da resina composta e a ausência de fibrilas colágenas que possam representar porções da camada híbrida na matriz intertubular do grupo controle (figura 10).

Embora este estudo tenha evidenciado, de maneira inequívoca, os efeitos benéficos da *α -wollastonita* sobre a resistência adesiva e a longevidade da interface de união; é possível que o sistema adesivo selecionado também tenha favorecido

efeitos positivos, em combinação com a biopartícula. O sistema adesivo Single Bond Universal contém BisGMA e HEMA. A adição de HEMA melhora a hidrofilicidade e a capacidade de ligação do adesivo (Van Landuyt et al., 2007), diminui sua viscosidade, melhorando a infiltração de monômeros na dentina desmineralizada e a formação de tags resinosos (Delaviz et al., 2014). O BisGMA tem alto peso molecular, o que promove excelentes propriedades mecânicas (Zhang et al., 2015). Além disso, tem o bisfenol-A como o núcleo de sua estrutura química, tornando-a muito rígida, conferindo resistência mecânica ao polímero (Van Landuyt et al., 2007; Pashley et al., 2007). A molécula de BisGMA possui ainda dois grupos hidroxila pendentes, que podem formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila em moléculas adjacentes de BisGMA (Zhang et al., 2015).

Como foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos de armazenamento de 24 h e 12 meses, com redução das médias de resistência adesiva em ambos os grupos (tabela 2), a segunda hipótese de nulidade — o tempo de armazenamento, não influencia a resistência de união; deve ser rejeitada. Esses resultados corroboram com numerosos estudos, que evidenciaram a redução dos valores de resistência adesiva longitudinal, quando amostras são armazenadas imersas em meio aquoso (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2005; Erhardt et al., 2008a; Carvalho et al., 2013; Pinna et al., 2015). Apesar de a água hidrolisar ligações peptídicas da matriz colágena, resultando na diminuição progressiva das propriedades mecânicas da interface, favorecendo sua degradação ao longo do tempo (Carrilho et al., 2005), reduzindo a integridade estrutural da interface adesiva a longo prazo (Pashley et al., 2004; Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2010; Mobarak, 2011; Sartori et al., 2015); as limitações da interface adesiva também guardam relação direta com a degradação dos materiais resinosos, prejudicando suas propriedades físico-mecânicas, como sua resistência adesiva à microtração (Pashley, Carvalho, 1997; Zhang, Xu, 2008). A degradação hidrolítica da interface adesiva pode ser potencializada em adesivos dentinários ricos em BisGMA e HEMA (Park et al., 2011; Reis et al., 2013; Takahashi et al., 2011), justamente por serem muito hidrofílicos. A grande hidrofilicidade do adesivo predispõe à absorção de água que, assim como a retenção de solventes e/ou água durante a polimerização, compromete a integridade da interface adesiva (Reis et al., 2013). A água, presente na dentina condicionada e desmineralizada, pode causar a separação de fases do adesivo. Por sua característica hidrófoba, o BisGMA tende a migrar para a fase resinosa; e o HEMA

(hidrófila), para a fase aquosa (Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2009; Park et al., 2011). Devido a isso, a fase resinosa polimeriza adequadamente, o que não ocorre na fase aquosa. Quando a polimerização da fase hidrófila é incompleta, os grupos funcionais atuam como monômeros residuais ou radicais não reativos. Assim, a água se difunde entre os sítios hidrófilos pouco polimerizados, solubilizando os monômeros não reativos, fragilizando a união adesiva. A combinação, entre degradação e separação dos componentes resinosos, prejudica a integridade e durabilidade adesiva (Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2009; Abedin et al., 2014).

O armazenamento direto, por até 6 meses, em água, diminuiu significativamente os valores de resistência de união em estudos prévios (Deng et al., 2014; Reis et al., 2015). No presente estudo, os palitos foram armazenados diretamente em água, por 24 h e 12 meses, e reduções estatisticamente significativas foram evidenciadas na resistência adesiva. Embora tenha havido redução proporcional nas médias de resistência adesiva tanto para o grupo A, quanto para o grupo WAS ao longo de 12 meses (em torno de 16 %), a resistência adesiva no grupo WAS, mesmo após 12 meses, ainda se manteve maior que a do grupo A, armazenado por apenas 24 h. Estes dados são suportados por Zhang et al. (2015) e Profeta et al. (2012), cujos estudos evidenciaram que biopartículas melhoraram a durabilidade da união dentina-resina, através de efeito terapêutico/protetor, associado a deposição mineral no interior da interface adesiva e interferindo na atividade enzimática colagenolítica exercida pelas MMPs.

Os efeitos deletérios da hidrólise dos componentes da interface adesiva são evidenciados ainda, pela variação nos modos de falha. No grupo A, predominaram falhas adesivas, tanto após 24 h de armazenamento, quanto após 12 meses (49% e 56%, respectivamente), assim como observado por profeta et al. (2012). No grupo WAS predominaram falhas mistas (58%), após armazenamento por 12 meses; diferindo dos achados de Profeta et al. (2012) onde, após 6 meses, predominaram falhas adesivas no grupo que recebeu biopartícula como pré-tratamento à dentina condicionada. Falhas coesivas ocorreram em todos os grupos, sendo mais frequentes após armazenamento por 24 h em ambos os grupos, corroborando com achados de Profeta et al. (2012). O predomínio de falhas mistas no grupo WAS, após 12 meses de armazenamento, guarda relação direta com os resultados do módulo de Weibull (tabela 3), uma vez que, mesmo após período comprovadamente suficiente para que os efeitos da degradação hidrolítica resultassem em redução da resistência de união

(Carrilho et al., 2005; Deng et al., 2014; Liu et al., 2011; Profeta et al., 2012; Reis et al., 2015; Zhang et al., 2015), o referido grupo manteve média de resistência de união mais elevada que o grupo controle, ainda que comparada ao período de armazenamento de 24 h. A maior resistência adesiva no grupo WAS, após 12 meses, se refletiu em menor valor do módulo de Weibull e, conseqüentemente, em maior variabilidade dos modos de falha, com predomínio de falhas mistas (Bergamo et al., 2021).

Diante do exposto, dentro das limitações deste estudo, os autores acreditam que a redução observada na resistência adesiva, se deveu principalmente à degradação hidrolítica dos componentes dos materiais restauradores resinosos (Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2011; Reis et al., 2013; Takahashi et al., 2011), e à degradação hidrolítica do colágeno. Uma vez que, a dissolução da hidroxiapatita, resultando na desmineralização dentinária, ocorreu de forma proporcional tanto no grupo WAS quanto no grupo A; com a diferença de que, no grupo tratado com a α -*wollastonita* (WAS), a proteção imediata, pela deposição dos cristais de hidroxiapatita sobre a rede de fibrilas colágenas expostas pelo condicionamento ácido, resultou em maior resistência adesiva inicial. A resistência adesiva se reduziu proporcionalmente, devido à dissolução da hidroxiapatita, que ocorreu naturalmente tanto no grupo A, quanto no WAS. Mantendo-se, portanto, comparativamente maior, mesmo após 12 meses, no grupo WAS.

7 CONCLUSÃO

A aplicação de biopartícula α -*wollastonita* aumentou a resistência de união adesiva em dentina, tanto após envelhecimento em água deionizada por 24 h, quanto por 12 meses. Houve preservação do colágeno ao longo dos períodos de armazenamento, e a resistência adesiva permaneceu maior no grupo tratado com α -*wollastonita* após 12 meses de armazenamento, mesmo quando comparado com o grupo controle armazenado por 24 h.

REFERÊNCIAS*

- Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two selfetching adhesives bonded to dentin. *J Dent*. 2008 Aug;36(8):611-7. doi: 10.1016/j.jdent.2008.04.011. Pubmed PMID: 18514996.
- Abedin F, Ye Q, Good HJ, Parthasarathy R, Spencer P. Polymerization- and solventinduced phase separation in hydrophilic-rich dentin adhesive mimic. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):3038-47. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.001. Pubmed PMID: 24631658.
- Aly IHM, Mohammed LAA, Al-Meer S, Elsaid K, Barakat NAM. Preparation and characterization of wollastonite/titanium oxide nanofiber bioceramic composite as a future implant material. *Ceram Int*. 2016;42(10):11525-34. doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.060.
- D'Arcangelo C, Vanini L, Prosperi GD, Di Bussolo G, De Angelis F, D'Amario M, et al. The influence of adhesive thickness on the microtensile bond strength of three adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2009;11(2):109-15.
- Amaral CM, Diniz AM, Arantes EB, Dos Santos GB, Noronha-Filho JD, da Silva EM. Resin-dentin bond stability of experimental 4-meta-based etch-and-rinse adhesives solvated by ethanol or acetone. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):513-20. doi: 10.3290/j.jad.a37200. Pubmed PMID: 27869252.
- Armstrong S, Geraldini S, Maia R, Raposo LH, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e50-62. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.155. Pubmed PMID:20045179.
- Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfeifferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater*. 2017 Feb;33(2):133-43. doi: 10.1016/j.dental.2016.11.015. Pubmed PMID: 28007396.
- Bachmann L, Diebolder R, Hibst R, Zezell DM. Infrared absorption bands of enamel and dentin tissues from human and bovine teeth. *Appl Spectrosc Rev*. 2003;38(1):1–14.
- Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*. 2014;30(1):62–76. doi: 10.1016/j.dental.2013.10.012. PMID: 24309436.
- Bergamo ETP, Cardoso KB, Lino LFO, Campos TMB, Monteiro KN, Cesar PF, et al. Alumina-toughened zirconia for dental applications: Physicochemical, mechanical, optical, and residual stress characterization after artificial aging. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2021;109(8):1135–44. doi: 10.1002/jbm.b.34776. PMID: 33314536.

Brännstrom M, Linden LA, Astrom A. The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res.* 1967;1(4):310-7. doi:10.1159/000259530. Pubmed PMID: 5241870.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955;34(6):849-53.

Camargo MA, Silveira BL, Delfino CS, Zaroni WCS, Matos AB. Ensaio de microtração: uma revisão crítica da literatura. Microtensile bond test: a literature overview. *Rev Inst Ciênc Saúde.* 2007;25(3):313-8.

Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005 Dec;18(6):315-9. Pubmed PMID: 16433398.

Carvalho FG, Carlo HL, Sacramento PA, Barros S, Santos RL, Puppim-Rontani RM. Biodegradation of caries-affected dentin bonding interface of fluoride and MDPB97 containing adhesive system. *Int J Adhes Adhes.* 2013;47:134-40. doi:10.1016/j.ijadhadh.2013.08.008.

Carvalho RM, Manso AP. Biodegradation of resin-dentin bonds: a clinical problem? *Curr Oral Health Rep.* 2016;3(3):229-33. doi:10.1007/s40496-016-0104-0.

Cerruti M, Sahai N. Silicate biomaterials for orthopaedic and dental implants. *Rev Mineral Geochem.* 2006;64(1):283–313.

Chang J, Chen L. Silicate-based bioactive materials bone regeneration. In: *Biomaterials in Asia: In commemoration of the 1st Asia Biomaterials Congress.* Shanghai: World Scientific; 2008. p. 343-5.

Chen C, Weir MD, Cheng L, Lin NJ, Lin-Gibson S, Chow LC, Zhou X, Xu HH. Antibacterial activity and ion release of bonding agent containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *Dent Mater.* 2014 Aug;30(8):891-901. doi: 10.1016/j.dental.2014.05.025. Epub 2014 Jun 18. PMID: 24954647; PMCID: PMC4559225.

Choudhary R, Venkatraman SK, Rana A, Swamiappan S. In vitro bioactivity studies of larnite and larnite/chitin composites prepared from biowaste for biomedical applications. *Bull Mater Sci.* 2016;39(5):1213–21.

Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater.* 2014 Jan;30(1):16-32. doi: 10.1016/j.dental.2013.08.201. Epub 2013 Oct 7. PMID: 24113132.

Deng D, Yang H, Guo J, Chen X, Zhang W, Huang C. Effects of different artificial ageing methods on the degradation of adhesive-dentine interfaces. *J Dent.* 2014 Dec;42(12):1577-85. doi: 10.1016/j.jdent.2014.09.010. Pubmed PMID: 25257825.

Ebisawa Y, Kokubo T, Ohura K, Yamamuro T. Bioactivity of CaO · SiO₂-based glasses: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 1990;1(4):239–44.

Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent*. 2008a Dec;36(12):1068-73. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.002. Pubmed PMID: 18922612.

Erhardt MC, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LA. In vitro microTBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008b Jul;86(1):181-7. doi: 10.1002/jbm.b.31004. Pubmed PMID: 18161781.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater*. 2008c Jun;24(6):786-98. doi: 10.1016/j.dental.2007.09.007. Pubmed PMID: 18023859.

Erhardt MC, Lobo MM, Goulart M, Coelho-de-Souza FH, Valentino TA, Pisani-Proença J, et al. Microtensile bond strength of etch-and-rinse and self-etch adhesives to artificially created carious dentin. *Gen Dent*. 2014 May-Jun;62(3):56-61. Pubmed PMID: 24784516.

Escibano N, Del-Nero O, de la Macorra JC. Sealing and dentin bond strength of adhesive systems in selected areas of perfused teeth. *Dent Mater*. 2001 Mar;17(2):149-55. doi:10.1016/S0109-5641(00)00057-9. Pubmed PMID: 11163385.

Eckert GJ, Platt JA. A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. *Dent Mater*. 2007;23(3):385–91. doi: 10.1016/j.dental.2006.02.007. PMID: 16540162.

Esteves SRMS, Barcellos DC, Silva TM Da, Silva MR, Campos TMB, Rosetti EP, et al. How Water Content Can Influence the Chemomechanical Properties and Physical Degradation under Aging of Experimental Adhesives. *Int J Dent*. 2022;2022:1–10. doi: 10.1155/2022/5771341.

Feitosa VP, Gotti VB, Grohmann CV, Abuna G, Correr-Sobrinho L, Sinhorette MA, et al. Two methods to simulate intrapulpal pressure: effects upon bonding performance of self-etch adhesives. *Int Endod J*. 2014 Sep;47(9):819-26. doi: 10.1111/iej.12222. Pubmed PMID: 24298904.

Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006 Mar;22(3):211-22. doi: 10.1016/j.dental.2005.05.005. Pubmed PMID: 16087225.

Finger WJ, Inoue M, Asmussen E. Effect of wettability of adhesive resins on bonding to dentin. *Am J Dent*. 1994 Feb;7(1):35-8. Pubmed PMID: 9115677

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability - A literature review. *Dent Mater*. 2016. doi:

10.1016/j.dental.2015.11.007. PMID: 26743967.

Fu J, Kakuda S, Pan F, Hoshika S, Ting S, Fukuoka A, et al. Bonding performance of a newly developed step-less all-in-one system on dentin. *Dent Mater J*. 2013;32(2):203-11. doi: 10.4012/dmj2012-204. Pubmed PMID: 23538754.

Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res*. 1979 Apr;58(4):1364-70. doi: 10.1177/00220345790580041101. PMID: 372267.

Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62. Pubmed PMID: 1066114.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 01;3:711-35. Pubmed PMID: 21196346

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(3):306-11. doi:10.1002/jbm.10208. Pubmed PMID: 12115762.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003 Sep;24(21):3795-803. doi:10.1016/S0142-9612(03)00262-X. Pubmed PMID: 12818552.

Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005 Aug;84(8):741-6. doi: 10.1177/154405910508400811. Pubmed PMID: 16040733.

Heimke G. Advanced ceramics for biomedical application. *Adv Mater*. 1989;28:111–6.

Ho Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxicity of formaldehyde on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(2):340–4. doi: 10.1002/jbmb. PMID: 17385229.

Hosaka K, Nakajima M, Yamauti M, Aksornmuang J, Ikeda M, Foxton RM, et al. Effect of simulated pulpal pressure on all-in-one adhesive bond strengths to dentine. *J Dent*. 2007 Mar;35(3):207-13. doi: 10.1016/j.jdent.2006.08.001 Pubmed PMID: 16989931.

Hulbert SF, Hench LL, Forbers D, Bowman LS. History of bioceramics. *Ceram Int*. 1982;8(4):131–40.

International Organization for Standardization. ISO/TR 11405:1994: dental materials - guidance on testing of adhesion to tooth structure [Internet]. Geneva: ISO; 1994 [cited 2021 Dec 08]. Available from: <http://www.iso.org/standard/31486.html>

Kato G, Nakabayashi N. The durability of adhesion to phosphoric acid etched, wet

dentin substrates. *Dent Mater*. 1998 Sep;14(5):347-52. doi:10.1016/S0109-5641(99)00003-2. Pubmed PMID: 10379265

Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater*. 2000 Jan;16(1):1-6. doi:10.1016/S0109-5641(99)00061-5. Pubmed PMID: 11203517.

Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater*. 1998;46(7):2519–27.

Kokubo T, Ebisawa Y, Yamamuro T, Ohura K. Bioactivity of CaO-SiO₂-based glasses: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 1990;1(4):239–44.

Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park JG, et al. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):394-401. doi: 10.1002/jbm.b.31095. Pubmed PMID: 18395826.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007;28(26):3757–85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.044. PMID: 17543382.

Lee SY, Greener EH, Mueller HJ. Effect of food and oral simulating fluids on structure of adhesive composite systems. *J Dent*. 1995 Feb;23(1):27-35. doi:10.1016/0300-5712(95)90657-4. Pubmed PMID: 7876413.

Leme AA, Vidal CM, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *J Biomech*. 2015 Jul 16;48(10):2067-71. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.03.016. Pubmed PMID: 25869721.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):679-728. Pubmed PMID: 8292714

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011 Aug;90(8):953-68. doi: 10.1177/0022034510391799. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220360; PMCID: PMC3148178.

Loguercio AD, Barroso LP, Grande RH, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent*. 2005 Summer;7(2):151-8. Pubmed PMID: 16052764

Marghalani HY, Watts DC. Viscoelastic stability of resin-composites aged in foodsimulating solvents. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):963-70. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.009. Pubmed PMID: 23910977.

Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosa M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *J*

Dent. 2014 May;42(5):603-12. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.008 Pubmed PMID: 24373855.

Maske TT, Isolan CP, van de Sande FH, Peixoto AC, Faria ESAL, Cenci MS, et al. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis. Clin Oral Investig. 2015 Jun;19(5):1047-53. doi: 10.1007/s00784-014-1331-1. Pubmed PMID: 25323985.

Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. J Dent Res. 2012 May;91(5):467-72. doi: 10.1177/0022034512439210. Pubmed PMID: 22354448.

Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. J Dent Res. 2015 Feb;94(2):241-51. doi: 10.1177/0022034514562833. Pubmed PMID: 25535202.

Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. J Dent Res. 1992;71(8):1530-40. doi: 10.1177/00220345920710081301. PMID: 1506519.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. Dent Mater. 2010 Feb;26(2):e100-21. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.148. Pubmed PMID: 20006379.

Mobarak EH. Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure. Oper Dent. 2011 Nov-Dec;36(6):649-60. doi: 10.2341/11-018-L. Pubmed PMID: 21864128.

Mobarak EH, Daifalla LE. Long-term nanoleakage depth and pattern of cervical restorations bonded with different adhesives. Oper Dent. 2012 Jan-Feb;37(1):45-53. doi: 10.2341/11-166-L. Pubmed PMID: 21942238.

Moraes RR, Marimon JL, Schneider LF, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Bueno M. Effects of 6 months of aging in water on hardness and surface roughness of two microhybrid dental composites. J Prosthodont. 2008 Jun;17(4):323-6. doi: 10.1111/j.1532-849X.2007.00295.x. Pubmed PMID: 18266654.

Moreau JL, Sun L, Chow LC, Xu HH. Mechanical and acid neutralizing properties and bacteria inhibition of amorphous calcium phosphate dental nanocomposite. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011 Jul;98(1):80-8. doi: 10.1002/jbm.b.31834. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21504057; PMCID: PMC3375606.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res. 2003;82(2):136-40.

De Munck J, Luehrs AK, Poitevin A, Van Ende A, Van Meerbeek B. Fracture toughness versus micro-tensile bond strength testing of adhesive-dentin interfaces.

Dent Mater. 2013 Jun;29(6):635-44. doi: 10.1016/j.dental.2013.03.010. Pubmed PMID: 23570626.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res. 1982;16(3):265–73. doi: 10.1002/jbm.820160307. PMID: 7085687.

Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiporn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. Jpn Dent Sci Rev. 2011;47(2):102-14. doi: 10.1016/j.jdsr.2011.03.002.

Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. J Dent Res. 1995 Oct;74(10):1679-88. doi: 10.1177/00220345950740100901. Pubmed PMID: 7499591.

Naseri M, Eftekhar L, Gholami F, Atai M, Dianat O. The effect of calcium hydroxide and nano-calcium hydroxide on microhardness and superficial chemical structure of root canal dentin: an ex vivo study. J Endod. 2019 Sep;45(9):1148-54. doi: 10.1016/j.joen.2019.06.002. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31345570.

Van Noort R, Noroozi S, Howard IC, Cardew G. A critique of bond strength measurements. J Dent. 1989;17(2):61-7.

Núñez-Rodríguez LA, Encinas-Romero MA, Gómez-Álvarez A, Valenzuela-García JL, Tiburcio-Munive GC. Evaluation of Bioactive Properties of α and β Wollastonite Bioceramics Soaked in a Simulated Body Fluid. J Biomater Nanobiotechnol. 2018;09(03):263–76. doi: 10.4236/jbnb.2018.93015.

Oilo G, Olsson S. Tensile bond strength of dentin adhesives: a comparison of materials and methods. Dent Mater. 1990 Apr;6(2):138-44. doi: 10.1016/S0109-5641(05)80045-4. Pubmed PMID: 2127754.

Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL, Toledano M. Polymer nanocarriers for dentin adhesion. J Dent Res. 2014 Dec;93(12):1258-63. doi: 10.1177/0022034514551608. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25227634; PMCID: PMC4462807.

Özok AR, Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Effect of dentin perfusion on the sealing ability and microtensile bond strengths of a total-etch versus an all-in-one adhesive. Dent Mater. 2004 Jun;20(5):479-86. doi: 10.1016/j.dental.2003.07.004. Pubmed PMID: 15081555.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. Eur J Oral Sci. 2003 Apr;111(2):117-27. doi: 10.1034/j.1600-0722.2003.00026.x. Pubmed PMID: 12648263.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Misra A, Kieweg SL, Spencer P. Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured

bisGMA/HEMA dental resin. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jun 15;93(4):1245-51. doi: 10.1002/jbm.a.32617. Pubmed PMID: 19827107.

Park J, Eslick J, Ye Q, Misra A, Spencer P. The influence of chemical structure on the properties in methacrylate-based dentin adhesives. *Dent Mater*. 2011 Nov;27(11):1086-93. doi: 10.1016/j.dental.2011.07.011. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21816460; PMCID: PMC3190579.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microsc*. 1989 Mar;3(1):161-74; discussion 74-6. Pubmed PMID: 2662395.

Pashley DH. Smear layer: overview of structure and function. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:215-24. Pubmed PMID: 1508877.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997 Sep;25(5):355-72. doi: 10.1016/S0300-5712(96)00057-7. Pubmed PMID: 9241954.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21. doi:10.1177/154405910408300306. Pubmed PMID: 14981122.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1–16. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.016. PMID: 21112620.

Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007;20(1):7–20. PMID: 17380802.

Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e24-37. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149. Pubmed PMID: 20005565.

Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: its behaviour in adhesive bonding. *Aust Dent J*. 2015 Sep;60(3):276-93. doi: 10.1111/adj.12309. Pubmed PMID: 25790344.

Prati C, Pashley DH. Dentin wetness, permeability and thickness and bond strength of adhesive systems. *Am J Dent*. 1992 Feb;5(1):33-8. Pubmed PMID: 1524740.

Prati C, Chersoni S, Mongiorgi R, Pashley DH. Resin-infiltrated dentin layer formation of new bonding systems. *Oper Dent*. 1998 Jul-Aug;23(4):185-94. Pubmed PMID: 9760921

Profeta AC, Mannocci F, Foxton R, Watson TF, Feitosa VP, De Carlo B, et al. Experimental etch-and-rinse adhesives doped with bioactive calcium silicate-based micro-fillers to generate therapeutic resin-dentin interfaces. *Dent Mater*. 2013;29(7):729–41. doi: 10.1016/j.dental.2013.04.001. PMID: 23639454.

Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: A microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(4):353–62. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00974.x. PMID: 22813227.

Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:41-75. doi: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027. PMID: 15255762.

Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013 Jul-Aug;38(4):E1-E25. doi: 10.2341/12-258-LIT. Pubmed PMID: 23527523.

Reis A, Martins GC, de Paula EA, Sanchez AD, Loguercio AD. Alternative aging solutions to accelerate resin-dentin bond degradation. *J Adhes Dent.* 2015 Aug;17(4):321-8. doi: 10.3290/j.jad.a34591. Pubmed PMID: 26295065.

Reuter H. Sol-gel processes. *Adv Mater.* 1991;3:258–9. doi: 10.1002/adma.19910030510

Ribas RG, Montanheiro LA, Montagna LS, Falchete R, Lemes AP, Campos TMB, et al. Water uptake in PHBV/Wollastonite scaffolds: a kinetics study. *J Compos Sci.* 2019;3(3):74.

Roulet JF, Van Meerbeek B. Statistics: a nuisance, a tool, or a must? *J Adhes Dent.* 2007;9(3):287-8.

Salman SM, Salama SN, Abo-Mosallam HA. The crystallization behaviour and bioactivity of wollastonite glass-ceramic based on Na₂O–K₂O–CaO–SiO₂–F glass system. *J Asian Ceram Soc.* 2015;3(3):255–61.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a microtensile bond test. *Dent Mater.* 1994 Jul;10(4):236-40.

Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):136–51. doi: 10.1177/10454411010120020401. PMID: 11345524.

Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):177–83. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00525.x. PMID: 18353013.

Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007 Jun;23(6):705-13. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.010. Pubmed PMID: 16904175.

Sartori N, Peruchi LD, Phark JH, Lopes MM, Araujo E, Vieira LC, et al. Permeation of intrinsic water into ethanol- and water-saturated, monomer-infiltrated dentin bond interfaces. *Dent Mater*. 2015 Nov;31(11):1385-95. doi: 10.1016/j.dental.2015.08.159. Pubmed PMID: 26411647.

Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(6):1521–32. doi: 10.1007/s10856-012-4606-6. PMID: 22466816.

Sauro S, Pashley DH, Herrera C. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. *Int J Adhes Adhes*. 2016;69:39-57. doi: 10.1016/j.ijadhadh.2016.03.014.

Sengün A, Unlü N, Ozer F, Oztürk B. Bond strength of five current adhesives to caries-affected dentin. *J Oral Rehabil*. 2002;29(8):777–81. PMID: 12220346.

Seryotkin YV, Sokol EV, Kokh SN. Natural pseudowollastonite: crystal structure, associated minerals, and geological context. *Lithos*. 2012;134–135:75–90.

Sideridou ID, Achilias DS, Karabela MM. Sorption kinetics of ethanol/water solution by dimethacrylate-based dental resins and resin composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Apr;81(1):207-18. doi: 10.1002/jbm.b.30655. Pubmed PMID: 16941599.

Sideridou ID, Vouvoudi EC, Adamidou EA. Dynamic mechanical thermal properties of the dental light-cured nanohybrid composite Kalore, GC: effect of various food/oral simulating liquids. *Dent Mater*. 2015 Feb;31(2):154-61. doi: 10.1016/j.dental.2014.11.008. Pubmed PMID: 25523943.

Silva TM, Gonçalves LL, Pontes SO, Nunes RAF, Mendonça RP, Silva MR, et al. Adhesive system properties and its behavior under simulated pulpal pressure in sound and caries-affected dentin and aging. *Int J Adhes Adhes*. 2022;116(November 2021):1031–9. doi: 10.1016/j.ijadhadh.2022.103139.

Singh V, Misra A, Marangos O, Park J, Ye Q, Kieweg SL, et al. Viscoelastic and fatigue properties of model methacrylate-based dentin adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):283-90.

Song L, Ye Q, Ge X, Misra A, Tamerler C, Spencer P. New silyl-functionalized BisGMA provides autonomous strengthening without leaching for dental adhesives. *Acta Biomater*. 2019;83:130–9. doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.033.

Shibata S, Vieira LC, Baratieri LN, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, et al. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2016;35(2):166-73. doi: 10.4012/dmj.2014-330. Pubmed PMID: 27041004.

Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, et al.

Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent.* 1999 Autumn;1(3):211-8. Pubmed PMID: 11725669.

Skovron L, Kogeo D, Gordillo LA, Meier MM, Gomes OM, Reis A, et al. Effects of immersion time and frequency of water exchange on durability of etch-and-rinse adhesive. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Nov;95(2):339-46. doi:10.1002/jbm.b.31718. Pubmed PMID: 20860046.

Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(3):447–56. doi: 10.1002/jbm.10364.

Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010 Jun;38(6):1989-2003. doi: 10.1007/s10439-010-9969-6. Pubmed PMID: 20195761.

Spencer P, Ye Q, Park J, Misra A, Bohaty BS, Singh V, et al. Durable bonds at the adhesive/dentin interface: an impossible mission or simply a moving target? *Braz Dent Sci.* 2012;15(1):4-18. doi: 10.14295/bds.2012.v15il.790. Pubmed PMID:24855586.

Takahashi M, Nakajima M, Hosaka K, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Long-term evaluation of water sorption and ultimate tensile strength of HEMA-containing/-free one-step self-etch adhesives. *J Dent.* 2011 Jul;39(7):506-12. doi: 10.1016/j.jdent.2011.04.008. Epub 2011 May 6. PMID: 21575671.

Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Scheidel DD, Watanabe H, Erickson RL, et al. Influence of water storage on fatigue strength of self-etch adhesives. *J Dent.* 2015 Dec;43(12):1416-27. doi: 10.1016/j.jdent.2015.10.018. Pubmed PMID: 26520580.

Talungchit S, Jessop JLP, Cobb DS, Qian F, Geraldini S, Pashley DH, et al. Ethanol-wet bonding and chlorhexidine improve resin-dentin bond durability: Quantitative analysis using Raman spectroscopy. *J Adhes Dent.* 2014;16(5):441–50. doi: 10.3290/j.jad.a32695.

Taniguchi G, Nakajima M, Hosaka K, Iwamoto N, Ikeda M, Foxton RM, et al. Improving the effect of NaOCl pretreatment on bonding to caries-affected dentin using self-etch adhesives. *J Dent.* 2009 Oct;37(10):769-75. doi: 10.1016/j.jdent.2009.06.005. Pubmed PMID: 19589634.

Tay FR, Gwinnett AJ, Pang KM, Wei SH. Resin permeation into acid-conditioned, moist, and dry dentin: a paradigm using water-free adhesive primers. *J Dent Res.* 1996;75(4):1034-44.

Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials.* 2008;29(8):1127–37. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.001. PMID: 18022228.

Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH, Overview of dentin

structure. *Endod Topics*. 2012;20:3-29. doi:10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013;29(1):116–35. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.004. PMID: 22901826.

Tjaderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent*. 2015 Jan-Feb;40(1):4-18. doi: 10.2341/14-095-BL. Pubmed PMID: 25615637.

Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH, et al. Durability of resin-dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):885-92. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.030. Pubmed PMID: 16949659.

Vicente A, Molina S, Ortiz AJ, Bravo LA. Influence of food-simulating liquids on bond strength of brackets bonded with a HEMA-free and HEMA-containing self-etching primer. *Angle Orthod*. 2012 Mar;82(2):346-50. doi: 10.2319/032711-216.1. Pubmed PMID: 21830934.

Vouvoudi EC, Sideridou ID. Dynamic mechanical properties of dental nanofilled lightcured resin composites: Effect of food-simulating liquids. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Jun;10:87-96. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.007. Pubmed PMID: 22520421.

Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):141-5. Pubmed PMID: 12562889

Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2007 May;81(2):279-86. doi: 10.1002/jbm.a.30981. Pubmed PMID: 17120213.

Xuan W, Hou BX, Lu YL. Bond strength of different adhesives to normal and cariesaffected dentins. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Feb 5;123(3):332-6. Pubmed PMID: 20193255

Yamauti M, Hashimoto M, Sano H, Ohno H, Carvalho RM, Kaga M, et al. Degradation of resin-dentin bonds using NaOCl storage. *Dent Mater*. 2003;19(5):399-405.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):273-82. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):273-82.

Yasuda G, Inage H, Kawamoto R, Shimamura Y, Takubo C, Tamura Y, et al. Changes in elastic modulus of adhesive and adhesive-infiltrated dentin during storage in water. *J Oral Sci*. 2008 Dec;50(4):481-6. doi: 10.2334/josnusd.50.481. Pubmed PMID: 19106478.

Zhang L, Weir MD, Hack G, Fouad AF, Xu HHK. Rechargeable dental adhesive with

calcium phosphate nanoparticles for long-term ion release. *J Dent*. 2015;43(12):1587–95. doi: 10.1016/j.jdent.2015.06.009. PMID: 26144190.

Zhang Y, Xu J. Effect of immersion in various media on the sorption, solubility, elution of unreacted monomers, and flexural properties of two model dental composite compositions. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2477-83. doi: 10.1007/s10856-008-3369-6. Pubmed PMID: 18253815.